

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

(Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar)

# **Regenerative Eigenschaften von Laufbandtraining auf die Knochenstruktur der kastrierten Ratte**



Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock  
vorgelegt von

Konrad Schröpfer  
aus Amberg  
Rostock, 09.12.2014

Gutachter:

Prof. Dr. med. B. Vollmar, Rostock

PD Dr. med. I. Stratos, Rostock

Prof. Dr. med. T. Pohlemann, Homburg/Saar

Tag der Verteidigung: 22.09.2015

---

*Meinen Eltern*

# I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	4
II. Abkürzungen .....	7
III. Zusammenfassung.....	9
1 Einleitung .....	11
1.1 Knochenhomöostase und Osteoporose .....	11
1.2 Definition, Epidemiologie und Pathophysiologie der Osteoporose .....	13
1.3 Ursachen und Risikofaktoren für Osteoporose.....	14
1.4 Auswirkungen der Andropause auf das muskuloskelettale System.....	16
1.5 Therapiekonzepte bei Osteoporose .....	19
1.6 Trainingsformen und das muskuloskelettale System .....	20
2 Ziel der Studie .....	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Experimentelles Modell.....	23
3.1.1 Kastration und sham-Kastration .....	23
3.1.2 Laufbandtraining .....	24
3.2 Versuchsablauf und Versuchsgruppen .....	25
3.3 Untersuchungsmethoden.....	28
3.3.1 Mikro-Computertomographie ( $\mu$ -CT) .....	28
3.3.1.1 Definitionen der erhobenen Parameter.....	31
3.3.2 Biomechanische Testung.....	35
3.3.3 Laboranalyse .....	36
3.4 Statistische Analyse.....	36
4 Ergebnisse .....	37
4.1 Allgemeine Beobachtungen .....	37
4.2 $\mu$ -CT .....	37

4.2.1 Kortikaler Knochen.....	37
4.2.1.1 Qualitative Analyse .....	37
4.2.1.2 Quantitative Analyse .....	38
4.2.2 Trabekulärer Knochen .....	41
4.2.2.1 Qualitative Analyse .....	41
4.2.2.2 Quantitative Analyse .....	42
4.3 3-Punkt-Biegemessung.....	48
4.3.1 Maximale Haltekraft .....	48
4.3.2 Biegesteifigkeit.....	49
4.4 Serum-Testosteronspiegel.....	50
5 Diskussion.....	51
5.1 Diskussion von Material und Methode .....	51
5.1.1 Die Ratte als Versuchstier und Osteoporose Modell .....	51
5.1.2 Kastration als Tiermodell zur Induktion der Andropause .....	52
5.1.3 Übertragbarkeit vom Tiermodell auf den Menschen .....	54
5.1.4 Zeitpunkte der Untersuchung nach Kastration .....	55
5.1.5 Einfluss von Training auf das muskuloskelettale System .....	55
5.1.6 Diskussion der Untersuchungstechniken .....	58
5.1.6.1 $\mu$ -CT.....	58
5.1.6.2 3-Punkt-Biegemessung .....	60
5.2 Diskussion der Ergebnisse .....	63
5.2.1 Ossäre Veränderungen nach ORX .....	63
5.2.2 Strukturelle und funktionelle Auswirkungen der drei Laufmodalitäten.....	66
5.3 Klinische Relevanz .....	70
5.4 Limitationen und Ausblick .....	71
6 Thesen .....	73
7 Literatur .....	75
8 Danksagung .....	86

9 Eidesstattliche Erklärung .....	87
-----------------------------------	----

## II. Abkürzungen

μ-CT	Mikro-Computertomographie
μm	Mikrometer
ANOVA	Analysis of variance
B.Ar	Mean total crossectional bone area
BMD	Bone mineral density
BV	Bone volume
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
Conn.D	Connectivity density
d	Tag
d.h.	das heißt
DA	Degree of anisotropy
DXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERα	Östrogen-Rezeptor α
g	Gramm
kg	Kilogramm
m	Meter
mg	Milligramm
MIL	Mean Intercept Length
min	Minuten
mind.	mindestens
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
N	Newton
NF-κB	Nuclear factor kappa of activated B-cells
o. D.	ohne Dimension
OPG	Osteoprotegrin

---

ORX	Orchiektomie
p	Wahrscheinlichkeit
RANK	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
ROI	region of interest
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SERMs	selektive Östrogenrezeptormodulatoren
SMI	Structure model index
sog.	sogenannte(n)
t	Zeit
T.Ar	Mean total crosssectional tissue area
Tb.N	Trabecular number
Tb.Sp	Trabecular separation
Tb.Th	Trabecular thickness
TV	Tissue volume
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allen
V <sub>max</sub>	Maximalgeschwindigkeit
VOI	Volume of interest
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Wo	Wochen
z.B.	zum Beispiel



### III. Zusammenfassung

Mechanische Belastung beeinflusst die Zusammensetzung, Struktur und mechanische Beschaffenheit des Knochens. Ein tiefgehendes Verständnis belastungsabhängiger Knochenadaptation stellt insbesondere im Hinblick auf die zunehmend älter werdende Population und die damit verbundenen Erkrankungen des Bewegungsapparates eine hohe sozioökonomische Relevanz dar. Das primäre Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, den Effekt der verschiedenen Laufbelastungen von bergauf (uphill), ebenem (level) und bergab (downhill) Laufen mit ihren unterschiedlichen Anteilen an exzentrischen und konzentrischen Muskelkontraktionen sowie ihren unterschiedlichen Belastungen durch das Körpergewicht auf den osteoporotischen Knochen zu untersuchen. Hierfür wurden männliche Wistar Ratten kastriert (ORX), um eine Osteoporose zu induzieren bzw. als Kontrolle sham-kastriert (sham) und nach 4, 8 und 12 Wochen (n=6 Tiere pro Gruppe) analysiert. Außerdem unterzogen sich jeweils 6 kastrierte Tiere einem 12-wöchigen Laufbandtraining, das entweder bei einer Steigung von 10°, in der Ebene, oder bei einem Gefälle von 10° ausgeführt wurde. Diese drei Laufgruppen wurden nach 12 Wochen mit kastrierten bzw. sham-kastrierten Tieren verglichen. Die Auswertung erfolgte mittels  $\mu$ -CT und 3-Punkt-Biegemessung der linken Tibia.

Der Serum-Testosteronspiegel lag bei den kastrierten Tieren zu jedem Zeitpunkt nach der Operation unterhalb der Nachweisgrenze ( $<0,2$  ng/ml), wohingegen sich die Werte bei sham-kastrierten Tieren zu keinem Untersuchungszeitpunkt unterschieden (4-Wo-sham:  $2,7 \pm 0,8$  ng/ml, 8-Wo-sham:  $2,4 \pm 0,9$  ng/ml, 12-Wo-sham:  $2,4 \pm 0,7$  ng/ml). Das kortikale Knochenvolumen zeigte keine Unterschiede innerhalb der Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten. In der quantitativen Analyse der kortikalen Knochenmineraldichte zeigten sich keine Unterschiede zwischen den sham- und ORX-Gruppen. Hingegen konnte die Knochenmineraldichte der Kortikalis durch uphill und downhill Laufen im Vergleich zu sham-kastrierten Tieren deutlich erhöht werden. Anhand der dreidimensionalen Rekonstruktionen konnte ein massiver Verlust von Spongiosa nach der Kastration beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich in der quantitativen Analyse des trabekulären Volumens, der trabekulären Anzahl und der trabekulären Knochenmineraldichte ein massiver Abfall bei den ORX-Gruppen im Vergleich zu den sham-Gruppen. Durch das Lauftraining konnte der durch die Kastration bedingte Verlust von Knochenvolumen, trabekulärer Anzahl und Knochenmineraldichte auf das Niveau der Kontrollgruppe wiederhergestellt werden. Die Analyse der Biegesteifigkeit und

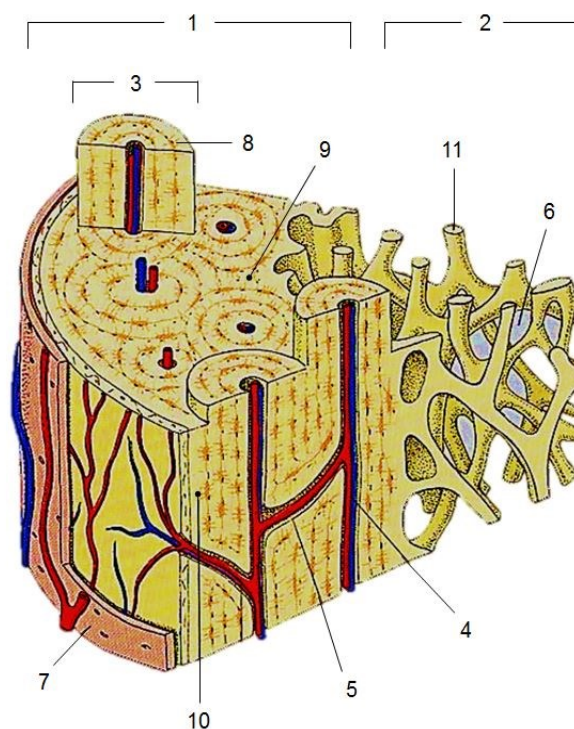
maximalen Haltekraft zeigte vorwiegend nach 8 Wochen reduzierte biomechanische Eigenschaften der Tibia in der ORX-Gruppe im Vergleich zur sham-Gruppe. Die reduzierte Biegesteifigkeit konnte bei kastrierten Tieren durch 12-wöchiges uphill Laufen auf das Niveau der Kontrollgruppe angehoben werden. Die Haltekraft wurde nach der Kastration durch das Training nicht beeinflusst.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die vorliegende Arbeit erste in vivo Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von drei unterschiedlichen Laufbelastungen auf die Regeneration des osteoporotischen Knochens aufzeigt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Lauftraining geeignet ist, den Knochenschwund bei Osteoporose aufzuhalten und dies unabhängig von der jeweiligen Trainingsmethode ist.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Knochenhomöostase und Osteoporose

Knochengewebe ist eine spezialisierte Form des Bindegewebes. Es baut das Skelett auf und bildet zusammen mit Muskeln und Gelenken den Bewegungsapparat. Der menschliche Körper besteht aus über 200 unterschiedlichen Knochen, die v. a. statische Funktionen im Sinne eines Stützgewebes übernehmen. Neben seiner Eigenschaft als Skelett, das das Gewicht des Körpers trägt, erfüllt der Knochen noch weitere Aufgaben. Er dient als Speicher für Ionen, wie Kalzium und Phosphat, und spielt somit eine wichtige Rolle im Kalziumstoffwechsel. Im Knochenmark werden Blutzellen synthetisiert, die von dort ins periphere Blut ausgeschwemmt werden. Darüber hinaus schützt der Knochen lebenswichtige Organe, wie das zentrale Nervensystem oder die Thoraxorgane Herz und Lunge.



**Abbildung 1:** Aufbau eines Lamellenknochens: Die Knochensubstanz besteht histologisch aus 2 Schichten: Der Kortikalis (1) (Substantia compacta, Synonym: Kompakta) und der Spongiosa (2) (Substantia spongiosa). Grundeinheit der Kortikalis ist das Osteon (3), ein System aus Lamellen, die konzentrisch um einen Kanal angeordnet sind, dem Havers-Kanal (4). Jedes Osteon ist ein an der Längsachse der Diaphy-

se verlaufender Zylinder. Innerhalb eines Havers-Kanal befinden sich Blutgefäße, Nerven und lockeres Bindegewebe. Schräg oder quer zur Längsachse der Havers-Kanäle verlaufende Kanäle bezeichnet man als Volkmann-Kanäle (5). Mit Hilfe dieser Kanäle kommunizieren die Havers-Kanäle untereinander, mit der Knochenmarkshöhle (6) oder dem Periost (7). Die Lamellen der Osteone werden Speziallamellen (8) genannt. Zwischen den Osteonen befinden sich Reste alter abgebauter Osteone, die als Schaltlamellen (9) bezeichnet werden. Innere Generallamellen kleiden die Markhöhle aus. Äußere Generallamellen (10) befinden sich unmittelbar unter dem Periost und umgeben somit das ganze Knochenelement.

Die Spongiosa ist ein feines, sich verzweigendes System aus Knochenbälkchen (11) (Trabekel), zwischen denen weite Räume für das Knochenmark oder Fettgewebe frei bleiben. *Abbildung modifiziert nach Trebsdorf [Trebsdorf 2002]*

Geflechtknochen tritt bei der Knochenneubildung auf und wird bei Erwachsenen fast überall durch Lamellenknochen (Abbildung 1) ersetzt.

Knochengewebe besteht aus drei verschiedenen Zelltypen: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

Osteoblasten liegen auf der Matrixoberfläche und sind für die Knochenneubildung verantwortlich, indem sie organische Komponenten der Knochenmatrix synthetisieren und sezernieren. Diese sind hauptsächlich Kollagen Typ I.

Osteozyten sind in der Matrix eingelagerte morphologisch veränderte Osteoblasten. Sie sind über Fortsätze untereinander, aber auch mit Osteoblasten an der Matrixoberfläche verbunden. Dadurch wird Stoffaustausch, etwa von Metaboliten und Signalstoffen, zwischen den Zellen ermöglicht.

Osteoklasten gehören zum mononukleären Phagozytensystem. Deren Vorläuferzellen, die Monozyten, entwickeln sich im Knochenmark und differenzieren sich in Osteoklasten. Osteoklasten können daher auch als knochenspezifische Makrophagen bezeichnet werden. Ein wichtiger Faktor für die Umwandlung der Vorläuferzellen in aktive Osteoklasten stellt das Cytokin Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) dar. Vorläuferzellen von Osteoblasten empfangen Signale von resorptionsauslösenden Faktoren, u.a. von Parathormon. Als Antwort auf diese Signale setzen die Vorläuferzellen selbst Cytokine wie RANKL frei. RANKL bindet an den RANK-Rezeptor an der Oberfläche von Osteoklastenvorläuferzellen und aktiviert so über die Stimulierung der Osteoklastenreifung den Knochenabbau [Suda et al. 1999].

Knochen ist also ein metabolisch aktives Gewebe, das lebenslänglichen Umbauvorgängen unterliegt. Dieses sogenannte remodeling wird angeregt durch mechanische Belastung, Änderungen im Kalzium- und Phosphathaushalt und als Antwort auf verschiedene parakrine und endokrine Faktoren [Sims und Gooi 2008]. Wie bereits erwähnt, wird der Abbau durch Osteoklasten [Roodman 1999; Teitelbaum 2000], die

Knochenneubildung durch Osteoblasten [Datta et al. 2008] bewerkstelligt. Dabei ist eine Homöostase, also das Gleichgewicht zwischen Knochenneubildung und Knochenresorption, entscheidend für die physiologische Struktur des Knochens. So überwiegt bei Osteoporose der Knochenabbau durch Osteoklasten, was eine Demineralisation des Knochens zur Folge hat. Das führt zu Strukturverlust und verminderter Tragfähigkeit der Knochen, die v. a. durch Spätkomplikationen wie Wirbel- und Schenkelhalsfrakturen gekennzeichnet sind. Die Folge sind chronische Schmerzen und eine Einschränkung der Lebensqualität [Kerschan-Schindl et al. 2012].

## **1.2 Definition, Epidemiologie und Pathophysiologie der Osteoporose**

Osteoporose ist definiert als eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) liegt eine Osteoporose vor, wenn die Knochenmineraldichte, gemessen mittels der Knochendichtemessung, um 2,5 Standardabweichungen unter dem statistischen Mittelwert gesunder, junger Erwachsener mit maximaler Knochendichte liegt [Genant et al. 1999]. Das Verfahren der Wahl zur Messung der Knochendichte ist die Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA) [Adams 2012]. Der erhaltene Dichtewert wird in Standardabweichungen angegeben und auch als T-score bezeichnet. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass ein niedriger T-score, also eine verminderte Knochendichte, mit einem erhöhten Frakturrisiko einhergeht [Miller et al. 2002; Marshall et al. 1996; Cummings et al. 1993].

Osteoporose ist die häufigste Skeletterkrankung im höheren Lebensalter und betrifft ca. 200 Millionen Menschen weltweit [Lin und Lane 2004], wobei die postmenopausale Osteoporose der Frau die häufigste Entität darstellt. Das weibliche Geschlecht stellt zwar einen Risikofaktor dar, der Knochenmasseabbau ist jedoch auch beim männlichen Geschlecht als chronische Erkrankung eine wesentliche Ursache für Frakturen [Looker et al. 1997]. Unter Personen ab 50 Jahren entfallen ca. 40% aller osteoporotischen Frakturen weltweit auf Männer [Johnell und Kanis 2006]. Durch Osteoporose bedingte pathologische Frakturen treten bei Männern ca. 10 Jahre später auf, da sie eine höhere Knochenmasse aufweisen als Frauen [Cooper und Melton 1992]. Die Mortalität nach osteoporotischen Frakturen ist demnach bei Männern höher

als bei Frauen [Center et al. 1999; Haentjens 2010], da sie zum Zeitpunkt der Fraktur älter sind und eine höhere Komorbidität besteht [Poor et al. 1995].

Der physiologische Knochenstoffwechsel ist durch ein Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenbildung gekennzeichnet.

Wesentlich für die Resorption durch die Osteoklasten ist die Sekretion von Protonen ( $H^+$ -Ionen) und somit ein niedriger pH-Wert. Dieses saure Milieu wird durch aktiven Protonentransport durch eine membranständige vakuoläre Adenosintriphosphatase (V-ATPase) aufrechterhalten. Zunächst wird dadurch der mineralische Bestandteil der Knochenmatrix herausgelöst. Anschließend wird der organische Teil der Knochenmatrix, hauptsächlich Kollagen Typ 1, durch Kathepsine abgebaut. Die abgebauten Bestandteile der Knochenmatrix werden durch die Osteoklasten phagozytiert [Manolagas 2000; Teitelbaum 2000].

Osteoblasten synthetisieren und sezernieren die Knochenmatrix bildenden Proteine. Diese sind überwiegend Kollagen Typ 1, sowie nicht kollagene Proteine. Osteocalcin und Osteonektin machen 40% bis 50% der nicht kollagenen Proteine aus. Diese noch weiche, nicht mineralisierte organische Grundsubstanz der Knochenmatrix wird auch Osteoid genannt. Durch die Einlagerung von Hydroxyapatitkristallen, welche den Hauptanteil der anorganischen Knochenmatrix bilden, wird der Knochen mineralisiert. Osteoblasten spielen auch bei der Mineralisation des Knochens eine wesentliche Rolle [Manolagas 2000; Silvent et al. 2013].

Osteoporose ist die Folge einer negativen Skelettbilanz, die durch ein Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und Neubildung zugunsten der Resorption hervorgerufen wird.

### **1.3 Ursachen und Risikofaktoren für Osteoporose**

Osteoporose kann in eine primäre (idiopathische) und sekundäre Form unterteilt werden.

Bei der primären Osteoporose unterscheidet man die postmenopausale Osteoporose (Typ I) sowie die senile Osteoporose (Typ II). Typ I tritt bei ca. 50% aller kaukasischen Frauen im Alter von 80 Jahren als Folge von Östrogenmangel auf [Ralston 2005]. Vom Typ II sind Frauen und Männer ab dem 70. Lebensjahr durch den Alterungsprozess betroffen [Lin und Lane 2004]. Die primäre Osteoporose kann daher als

pathologische Steigerung der normalen Altersveränderungen aufgefasst werden. Die größten Risikofaktoren der primären Osteoporose stellen neben dem Alter das Geschlecht, genetische Ursachen, Bewegungsmangel und bei Frauen die Menopause dar [Herold 2010]. Auch das individuelle Verhalten kann einen Risikofaktor darstellen. So kann übermäßiger Alkoholkonsum über Leberschäden, Hypogonadismus oder Nährstoffdefizite den Knochen indirekt negativ beeinflussen. Alkohol hat jedoch auch eine direkte schädigende Wirkung auf den Knochenmetabolismus, indem durch den exzessiven Genuss die Parathormon-Synthese gesteigert wird und die Konzentration von Vitamin-D-Metaboliten abfällt [Metcalf 2008]. Raucher haben ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Osteoporose, wobei der genaue Wirkmechanismus hierfür noch nicht hinreichend geklärt ist. Wahrscheinlich hat Tabak störende Auswirkungen auf Östrogene, Kalzium und Vitamin D [Fini et al. 2012]. Neben dem exzessiven Genuss von Alkohol und Rauchen sind geringe Sonnenlichtexposition, sowie ungenügende Kalziumaufnahme in der Kindheit und Adoleszenz weitere psychosoziale Faktoren, die Osteoporose begünstigen.

Der sekundären Osteoporose liegen andere Grunderkrankungen wie z.B. Hyperkortisolismus, Hyperthyreose, primärer Hyperparathyreodismus, chronische Lebererkrankungen, oder eine Langzeittherapie mit bestimmten Medikamenten zugrunde [Ebeling 2008]. So ist die Glukokortikoid-induzierte Osteoporose die häufigste sekundäre und iatrogen bedingte Form. Bereits eine tägliche orale Medikation ab 5 mg Prednisolon für länger als 3 Monate erhöht das Frakturrisiko [Buehring et al. 2013]. Für bestimmte enzyminduzierende Antikonvulsiva konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sie die Knochenmineralisation und den Kalziummetabolismus negativ beeinflussen können [Ensrud et al. 2008; Pack et al. 2008].

## 1.4 Auswirkungen der Andropause auf das muskuloskelettale System

Der Alterungsprozess ist mit einem Verlust von Geschlechtshormonen bei Frauen (Menopause) und Männern (Andropause) verbunden.

Die Andropause ist definiert als ein sich mit zunehmendem Alter entwickelndes Syndrom, das durch klinische Symptome und einem Mangel an Testosteron im Serum (unterhalb des Referenzbereichs junger, gesunder Erwachsener) charakterisiert ist. Allgemeingültige altersabhängige Referenzbereiche für Serum-Testosteron wurden jedoch noch nicht festgelegt [Huhtaniemi 2013]. Wu et al. schlugen als Grenzwerte 11 nmol/l für Gesamttestosteron und 220 pmol/l für freies Testosteron vor, wobei das freie Testosteron die physiologisch aktive Form ist und nur einen geringen Anteil des Gesamttestosterons darstellt. Der größte Teil ist an Albumin bzw. Sexualhormonbindendes Globulin gebunden. Bei Unterschreitung dieser Grenzwerte und Vorliegen von mind. drei sexualbezogenen Symptomen spricht man von Andropause [Wu et al. 2010].

Testosteron stellt das wichtigste Androgen dar. Unter Androgenen versteht man einen Sammelbegriff für alle männlichen Sexualhormone, die für die Ausbildung und Entwicklung sekundärer männlicher Geschlechtsmerkmale verantwortlich sind.

Während es bei Frauen mittleren Alters zu einem relativ abrupten und universalen Verlust der Funktion der Eierstöcke kommt, scheinen Männer hingegen einen allmählichen, unvollständigen Rückgang der Gonaden-Funktion zu entwickeln. Darüber hinaus zeigt der Rückgang der Sexualhormon-Synthese bei Männern ein hohes Maß an interindividueller Variabilität [Vermeulen 2000]. Trotz dieser individuellen Unterschiede ist es gut belegt, dass ab dem 40. Lebensjahr die testikuläre Testosteronproduktion um 1% bis 2% pro Jahr abfällt. Dieses Defizit an Testosteron wird für verschiedene Krankheitsbilder, wie zum Beispiel sexuelle Dysfunktion, Muskelschwäche, Adipositas, Depression und Osteoporose mitverantwortlich gemacht. Viele Männer bleiben jedoch trotz erniedrigter Testosteronwerte asymptomatisch [Huhtaniemi 2013].

Im männlichen Knochenmetabolismus erfüllen Androgene zwei Aufgaben. Erstens stimulieren sie die Knochenbildung während der Pubertät und zweitens unterdrücken sie die Knochenresorption während und nach der Pubertät [Vanderschueren et al. 2008]. In vitro Untersuchungen mit kultivierten Chondrozyten belegen die Wirkung auf Knochenreifung und Längenwachstum. So haben Androgene wohl direkten Einfluss



auf den Knorpel in Wachstumsfugen, indem sie die Proliferation und Differenzierung von kultivierten Chondrozyten aus Epiphysenfugen regulieren und somit das Längenwachstum des Knochens beeinflussen [Carrascosa et al. 1990; Blanchard et al. 1991; Krohn et al. 2003]. Ebenso konnte eine direkte Wirkung von Androgenen auf das Wachstum und die Reifung der Wachstumsfuge dadurch gezeigt werden, dass direkt injiziertes Testosteron in die Wachstumsfuge von Rattentibiae die Breite der Wachstumsfuge erhöht [Ren et al. 1989].

Androgene entfalten ihre pleiotropen Eigenschaften auch in der Muskulatur. Testosteron bewirkt eine Zunahme der Muskelmasse, indem es die Differenzierung in Muskelzellen aus mesenchymalen Stammzellen stimuliert [Bhasin et al. 2003]. Das ansteigende Muskelvolumen ist auch durch eine Hypertrophie der Muskelfasern bedingt. So konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Testosteron an gesunde, eugonadale Männer zu einem dosis-abhängigen Anstieg der Querschnittsfläche von Typ I und Typ II Muskelfasern führt [Sinha-Hikim et al. 2002]. Zusätzlich zu dieser Testosteron-induzierten Zunahme der Muskelfasergröße steigt die Anzahl der Satellitenzellen, die wesentlich für die Regenerationsfähigkeit der Skelettmuskulatur nach Trauma verantwortlich sind [Sinha-Hikim et al. 2003; Stratos et al. 2007]. Außerdem stimuliert Testosteron die Synthese von kontraktilen Muskelproteinen und hemmt deren Abbau [Ferrando et al. 2003]. Mit fortschreitendem Alter kommt es zu einem Verlust an Muskelmasse und dadurch zu einer Verminderung der Muskelkraft. Dieser altersassoziierte Muskelabbau wird als Sarkopenie bezeichnet und wird wie Osteoporose hauptsächlich durch den abfallenden Testosteronspiegel bei alternden Männern verursacht [Morley 2012].

Aber auch die anderen Bestandteile des Bewegungsapparates werden von Testosteron beeinflusst. So ist bekannt, dass Androgenrezeptoren in Bändern, wie dem vorderen Kreuzband, exprimiert werden und dass die im Serum zirkulierenden Androgene eine wichtige Rolle bei Wachstum und Entwicklung des vorderen Kreuzbandes spielen [Ohno et al. 2013]. Bei Versuchen mit Ratten fand man heraus, dass eine 6-wöchige tägliche Injektion von Testosteron in das mediale Außenband des Kniegelenks die Festigkeit des Bandes erhöht [Tipton et al. 1971]. Weniger eindeutig ist die Datenlage bezüglich des Einflusses auf Knorpelgewebe. Ein positiver Effekt von Testosteron auf männliche Vorläuferzellen von Chondrozyten in vitro konnte zwar gezeigt [Koelling und Miosge 2010] und eine erhöhte Testosteronkonzentration mit einer Volumenzunahme des Knorpels in Verbindung gebracht werden [Cicuttini et al. 2003]. Langzeitergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass eine positive Korrelation zwischen

Testosteron und dem Verlust von tibialen Knorpelvolumen bei gesunden Männern besteht [Hanna et al. 2005]. Außerdem zeigte sich in einer Studie mit orchiectomierten Mäusen, dass die Kontrollgruppe mit höheren Testosteronwerten eine ausgeprägtere Arthrose aufwies als die kastrierten Tiere. Darüber hinaus entwickelten kastrierte Mäuse, die mit Dihydrotestosteron supplementiert wurden, eine schwere Arthrose, die mit der Kontrollgruppe vergleichbar war [Ma et al. 2007]. Testosteron und seine Wirkung auf Sehnen wird nur selten erwähnt. Tierexperimentell gewonnene Erkenntnisse an Ratten und Mäusen lassen jedoch darauf schließen, dass es durch Androgeneinwirkung zu einer Schädigung des Kollagenanteils der Sehnenmatrix und somit zu einer Sehnenschädigung kommt [Michna 1987; Miles et al. 1992; Wood et al. 1988]

An den Ausfallerscheinungen nach dem Wegfall der Androgene – etwa nach der Kastration oder der Behandlung mit einem Antiandrogen – wird die physiologische Bedeutung dieser Hormone am deutlichsten erkennbar. Eine Androgendeprivationstherapie bei Männern mit Prostatakarzinom führt zu einem rasanten Knochenverlust, ähnlich wie bei Frauen nach Ovariectomie oder während der Menopause [Smith 2002]. Zusätzlich zum Abfall der Knochendichte führt der Androgenmangel zur Abnahme der fettfreien Körpermasse (lean body mass) und der Muskelmasse, was das Frakturrisiko wahrscheinlich weiter erhöht [Smith et al. 2002; Berruti et al. 2002]. Bei Männern mit Hypogonadismus lassen sich die Folgen von Testosteronmangel auf das Skelett ebenso gut beobachten. Hypogonadismus ist eine endokrine Funktionsstörung der Hoden, die zu anhaltend niedrigen Testosteronkonzentrationen führt. Die Ursache dieser Funktionsstörung kann eine Störung der Hodenfunktion (primärer Hypogonadismus) oder eine hypothalamisch-hypophysäre Fehlfunktion (sekundärer Hypogonadismus) sein. So ist bekannt, dass Männer mit Hypogonadismus, besonders in spongiösen Knochen wie in der Wirbelsäule, eine geringere Knochendichte als gleichaltrige gesunde Männer haben [Vanderschueren et al. 2004]. Bei unbehandelten hypogonadalen Männern konnte ebenfalls eine Verschlechterung der trabekulären Knochenarchitektur in der distalen Tibia mittels Mikro-Magnetresonanztomographie dargestellt werden [Benito et al. 2003]. Hypogonadismus kann seine Ursache in verschiedenen Krankheiten haben, die unterschiedliche Effekte auf das Skelett haben. Trotzdem zeigen betroffene Männer eine ähnliche Minderung der Knochendichte und zwar unabhängig von der zugrunde liegenden Entität. Dies bedeutet, dass Hypogonadismus an sich für den Knochenverlust verantwortlich ist und nicht die ursächliche Krankheit [Vanderschueren et al. 2004].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Verlust von Sexualhormonen zu einer Verschlechterung der Knochenstruktur führt und dass der entscheidende Faktor

für die Entstehung von Osteoporose bei Männern ein Abfall des Serum-Testosteronspiegels im Rahmen der Andropause ist, die einen natürlichen Bestandteil des Alterungsprozesses darstellt [Finkelstein et al. 1987; Finkelstein et al. 1992].

## 1.5 Therapiekonzepte bei Osteoporose

Obwohl Osteoporose die häufigste metabolische Knochenkrankheit ist, wird sie in hohem Maße zu selten diagnostiziert und nicht suffizient therapiert. Dies rührt zum Teil daher, dass sie klinisch stumm verläuft und sich erst durch Frakturen bemerkbar macht [Lin und Lane 2004]. Wenngleich Frauen nur unzureichend gegen Osteoporose behandelt werden, werden Männer noch mehr vernachlässigt. In einer retrospektiven Studie mit 363 Patienten mit Hüftfrakturen erhielten lediglich 27% der Männer und 71% der Frauen eine Therapie gegen Osteoporose [Kiebzak et al. 2002]. Zu Beginn eines erfolgreichen Therapieregimes sollten sekundäre Ursachen ausgeschlossen werden und das Frakturrisiko mit dem Fracture Risk Assessment Tool (FRAX) berechnet werden [Ebeling 2013].

### Allgemeine präventive Maßnahmen

- Optimierung der Kalziumzufuhr und Vitamin D Versorgung: Es sollten ausreichende Mengen an Kalzium möglichst mit der Nahrung zugeführt werden (1000-1300 mg/d). Falls über die Nahrung nicht genügend aufgenommen werden kann, ist eine Kalzium-Supplementierung sinnvoll. Die Dosis sollte 500 mg bis 600 mg/d nicht überschreiten. Die Vitamin-D<sub>3</sub>-Zufuhr sollte mind. 800 Internationale Einheiten/d betragen. Eine alleinige Kalzium Supplementierung oder in Kombination mit Vitamin D reduziert das Auftreten von osteoporotischen Frakturen bei Männern und Frauen über 50 Jahren um 12%.
- Testosteron-Substitution bei Hypogonadismus.
- Gewichtsbelastende Bewegungen mit Krafttraining, um die Muskelkraft und Koordination zu verbessern (mind. 3 Mal pro Woche).
- Rauchen einstellen und Alkoholkonsum auf maximal zwei Standardgetränke pro Tag reduzieren.
- Gegebenenfalls Hilfsmittel wie z.B. einen Rollator verwenden.

[Ebeling 2013]

**Medikamentöse Therapie**

Die am meisten verwendete Medikamentengruppe zur Behandlung von Osteoporose stellen Bisphosphonate dar. Sie binden spezifisch an Hydroxyapatit und werden während der Phagozytose der Knochenmatrix von Osteoklasten aufgenommen. Dort hemmen sie deren Funktion und somit die Knochenresorption. Das Resultat ist eine Reduzierung des Knochenabbaus und eine Senkung des Frakturrisikos [Fleisch 2003].

Das Antiresorptivum Denosumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der mit hoher Affinität an RANKL bindet und dessen Interaktion mit RANK hemmt. Es erhöht die Knochenmineraldichte und reduziert bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose und bei Männern mit Prostatakarzinom, die eine Hormontherapie erhalten, das Auftreten von Frakturen [Kaufman et al. 2013 a].

Die Einnahme von Strontiumranelat verringert das Risiko von Wirbel- und Nicht-Wirbelfrakturen bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose [Meunier et al. 2004; Reginster et al. 2005]. Auch wenn der Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, konnte gezeigt werden, dass die Knochenarchitektur durch Hemmung der Osteoklasten- und Steigerung der Osteoblastenaktivität verbessert wird [Ebeling 2013]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Medikation auch bei Männern mit Osteoporose eine Steigerung der Knochenmineraldichte und der ossären alkalischen Phosphatase bewirkt [Kaufman et al. 2013 b].

Teriparatid ist ein Parathormon-Derivat mit anaboler Wirkung auf das Skelett. Es ist besonders bei hohem Frakturrisiko und bei Glukokortikoid-induzierter Osteoporose indiziert [Kaufman et al. 2013 a].

Daneben kommen eine Hormonersatztherapie und speziell bei Frauen selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) in Frage.

## 1.6 Trainingsformen und das muskuloskelettale System

Die bei körperlicher Bewegung auftretenden mechanischen Belastungen spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Knochens [Turner 1998]. In ex vivo Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass eine intermittierende, dynamische Belastung effektiver als eine kontinuierliche, statische Belastung ist [Lanyon und Rubin 1984] und dass das Ausmaß der Belastung mit der Knochenmassezunahme korreliert [Rubin und Lanyon 1985]. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Bestimmung von in vivo Belastungen auf den Knochen unter physiologischen Bedingungen besteht Uneinigkeit über die wirksamste Trainingsmethode. Daher wurden in Tierversuchen mit Ratten schon viele Trainingsarten wie Kletterübungen [Notomi et al. 2001], Laufen [Notomi et al. 2000], Springen [Umemura et al. 1997], Landen aus freiem Fall [Welch et al. 2004] und Schwimmübungen mit Mäusen [Buie und Boyd 2010] untersucht. Jedoch sind es v.a. gewichtsbelastende Übungen wie Laufen und Springen, die für ihr hohes osteogenes Potential bekannt sind [Notomi et al. 2000; Umemura et al. 1997; Welch et al. 2004]. Im Gegensatz dazu konnte bei weniger knochenstimulierenden Übungen wie Schwimmen teilweise ein gegensinniger Effekt gezeigt werden [Buie und Boyd 2010]. Es wird daher davon ausgegangen, dass gewichtsbelastende Aktivitäten wie Laufen eher einen nachweisbaren Effekt auf die Knochenstruktur haben, da hierdurch der ganze Knochen belastet und somit stimuliert wird.

Weiterhin ist bekannt, dass die Zugkräfte, die während der Muskelkontraktion auf den Knochen bei körperlicher Aktivität einwirken, ein bestimmender Faktor für die morphologischen und mechanischen Eigenschaften des Knochens sind [Burr 1997]. Daher können die Knochenverformungen, die z.B. bei Krafttraining durch die Zugkräfte des Muskels auftreten, die Knochenmasse erhöhen. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass verschiedene Muskelkontraktionsformen unterschiedliche Adaptionsvorgänge am Knochen hervorrufen.

Beim uphill Laufen kontrahiert der Muskel konzentrisch, beim downhill Laufen exzentrisch, wohingegen das Laufen auf einer horizontalen Ebene eine Zwischenstufe mit gleichen Anteilen konzentrischer und exzentrischer Kontraktionen darstellt [Armstrong et al. 1983]. Nur wenige neuere Studien haben den Effekt von konzentrischen und exzentrischen Muskelkontraktionen auf den Knochen verglichen. Insbesondere ist nicht bekannt, wie sich die unterschiedlichen Trainingsmodalitäten auf den Knochen des andropausalen Organismus auswirken.

Weiterhin gibt es bis heute keine Studien, die uphill-, level-, und downhill-Training unter gleichen Bedingungen untersucht haben und somit wissenschaftlich belegen, welche Trainingsform die effizientere ist, um die Knochenmasse zu erhöhen.

## **2 ZIEL DER STUDIE**

Ziel der vorliegenden experimentellen Untersuchungen war es, den regenerativen Einfluss von körperlicher Aktivität auf den Knochen im andropausalen Organismus zu analysieren. Dafür wurde auf folgende Punkte näher eingegangen:

- Einfluss von Kastration auf den kortikalen und spongiösen Knochen
- Einfluss von Kastration auf den Serum-Testosteronspiegel
- Einfluss von unterschiedlichen Trainingsmodalitäten auf den kortikalen und spongiösen Knochen in kastrierten Tieren bzw. ob durch Training eine Verbesserung der Knochenstruktur auftritt.

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Experimentelles Modell**

Die Versuche wurden an männlichen Wistar Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 375 g – 425 g durchgeführt. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum der Tierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock (Tierschutzbeauftragter Dr. rer. nat. D. Zechner) artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes, bei 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und unter Bereitstellung von Laborfutter für Nager und Wasser ad libitum in Einzelkäfigen gehalten. Das Forschungsvorhaben war von der Genehmigungsbehörde des Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt worden (Tierversuchsantrag 7221.3-1.1-034/13). Die Versuche erfolgten eine Woche nach Akklimatisation der Tiere an die Laborbedingungen.

#### **3.1.1 Kastration und sham-Kastration**

Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von Ketaminhydrochlorid 10% (Ketamin, Bela-Pharm, Vechta, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun<sup>®</sup>, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert (110 mg/kg Ketamin und 7 mg/kg Xylazin). Nach Abscheren der Skrotalbehaarung wurde die Ratte anschließend in Rückenlage auf eine Heizplatte (Klaus Effenberger, Medizinische Geräte, Pfaffing, Deutschland) gelegt. Nachdem die Hinterläufe mit weißem Klebeband (Leukosilk<sup>®</sup> S, BSN medical, Hamburg, Deutschland) fixiert wurden, erfolgte eine sorgfältige Hautdesinfektion mit Povidon-Iod (Betaisodona<sup>®</sup>, Mundipharma, Limburg, Deutschland). Die Kastration erfolgte an jedem Hoden einzeln „geschlossen“, d.h. unter Schonung des parietalen Blattes der Tunica vaginalis. Die Hoden wurden mit einem Einmalskalpell (Präzisa plus, P.J. Dahlhausen & Co., Köln, Deutschland) durch eine ca. 2 Zentimeter lange kranio-kaudale Inzision entlang der Längsachse des Hodens nacheinander einzeln freigelegt. Nach Durchtrennen des Ligamentum caudae epididymidis an seiner Insertion an der Tunica dartos mit der Schere wurde die eröffnete Wandung des Processus vaginalis nach proximal geschoben. Es wurde eine Arterienklemme auf den Samenstrang angelegt. Proximal der Arterienklemme wurde eine zweifache Samen-

strangligatur mit einem 3-0 resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 3-0, Johnson & Johnson, St-Stevens-Woluwe, Belgien) gesetzt. Nach dem Absetzen der Hoden kaudal der Arterienklemme wurde die Skrotalhaut etwas angehoben, damit sich die Samenstrangstümpfe in die Tiefe zurückziehen können. Der Wundverschluss erfolgte durch Adaption der Skrotalhaut mit 2 bis 3 Einzelknopfnähten mit einem ebenfalls 3-0 resorbierbarem Nahtmaterial, nachdem das Operationsfeld erneut mit Povidon-Iod gründlich desinfiziert worden war. Auf einen schichtweisen Wundverschluss wurde verzichtet, damit anfallendes Wundsekret ablaufen konnte. Die Dauer der OP betrug ca. 20 min pro Ratte. Postoperativ erhielten alle Tiere für 3 Tage Metamizol-Natrium (Novaminsulfon-ratiopharm®, Ratiopharm, Ulm, Deutschland, 200 mg/kg Körpergewicht per os im Trinkwasser). Kastrierte Tiere, die sich dem Lauftraining unterzogen, liefen frühestens 3 Tage nach der Operation.

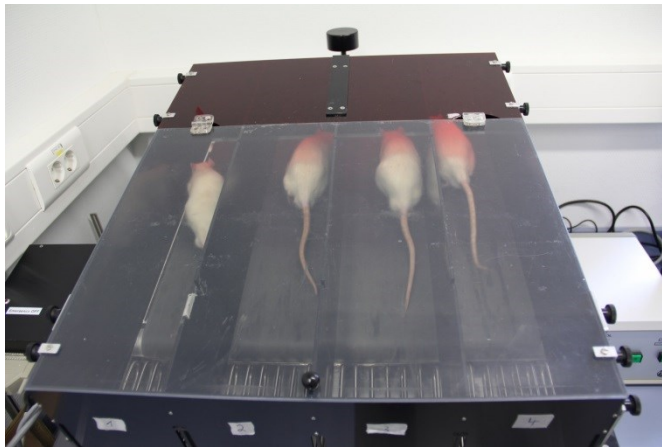
Bei der sham-Kastration galten grundsätzlich die gleichen prä-, intra- und postoperativen Bedingungen. Die freigelegten Hoden wurden jedoch nicht abgesetzt, sondern mit einer Moskitoklemme etwas mobilisiert und danach wieder in situ zurückgeschoben.

### **3.1.2 Laufbandtraining**

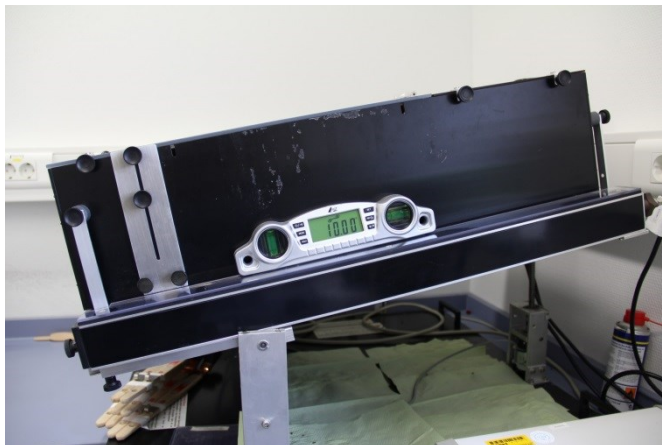
Nach einer Woche Akklimatisation wurden die Tiere, die dem Training unterzogen wurden, randomisiert den 3 Laufgruppen zugeteilt. Details zu den Versuchsgruppen und dem Laufprotokoll sind unter dem Punkt 3.2 aufgeführt. Das Training wurde 5 Tage die Woche (Montag bis Freitag) auf einem Laufband speziell für Ratten durchgeführt (TSE Treadmill – Modular treadmill for rats, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) (Abbildung 2). Mit einer digitalen Wasserwaage wurde der modifizierbare Neigungswinkel des Laufbands abgelesen (Abbildung 3).

Ein kontinuierliches Laufen wurde durch sanftes Berühren des Schwanzes bzw. des Hinterlaufs gewährleistet, wenn die Tiere sich ausruhen wollten oder nicht aktiv liefen. Auf eine vom Laufband automatisch verabreichte Stromapplikation wurde verzichtet. In die Studie wurden nur Tiere mit einbezogen, die aktiv liefen, oder mit geringem Aufwand bereit waren zu trainieren. Ein Tier wurde vom täglichen Training ausgeschlossen und in den Käfig zurückgestellt, wenn mehr als 20 Berührungen des Schwanzes bzw. des Hinterlaufs innerhalb eines Trainingstages nötig waren. Fünf Ratten wurden vom Experiment ausgeschlossen, da sie sich an drei folgenden Tagen nachhaltig weigerten zu bewegen.





**Abbildung 2:** Darstellung des Lauftrainings. Hier: uphill. 4 Tiere laufen gleichzeitig auf jeweils einer Bahn. Die einzelnen Bahnen sind durch Trennwände getrennt, sodass die Tiere sich nicht sehen können.



**Abbildung 3:** Der Neigungswinkel wurde mit einer digitalen Wasserwaage abgelesen. Hier: 10 Grad Steigung.

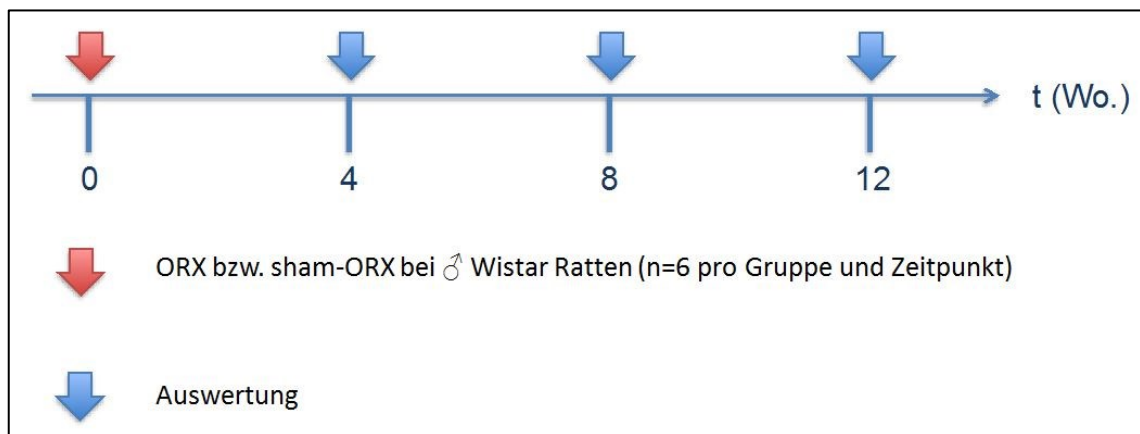
### 3.2 Versuchsablauf und Versuchsgruppen

Für die Versuche wurden insgesamt 54 männliche Wistar Ratten verwendet, die randomisiert einer Trainings- oder Kontrollgruppe zugeteilt wurden. Ein Teil der Tiere unterzog sich einer Kastration (Orchiektomie, ORX), der andere Teil als Kontrollgruppe einer sham-Kastration (sham). Für die Auswertung wurde die linke Tibia entnommen, nachdem die Tiere euthanasiert worden waren. Für die Euthanasie wurden die Ratten in eine tiefe Narkose versetzt und durch Ausbluten getötet. Die entnommenen Tibiae wurden in 70-prozentiger Alkohollösung bei ca. 7 Grad Celsius in einem Kühlschrank aufbewahrt. Der experimentelle Ablauf lässt sich in zwei Studienabschnitte gliedern.

### Studienabschnitt A

In einem Studienabschnitt A wurde der Einfluss von der durch Kastration induzierten Andropause auf den Knochen untersucht. Dazu wurden zu Beginn Ratten kastriert bzw. sham-kastriert und nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo) ausgewertet und miteinander verglichen (Abbildung 4). Daraus ergaben sich folgende 6 Gruppen mit jeweils 6 Tieren:

4 Wo sham ORX	8 Wo sham ORX	12 Wo sham ORX
4 Wo ORX	8 Wo ORX	12 Wo ORX



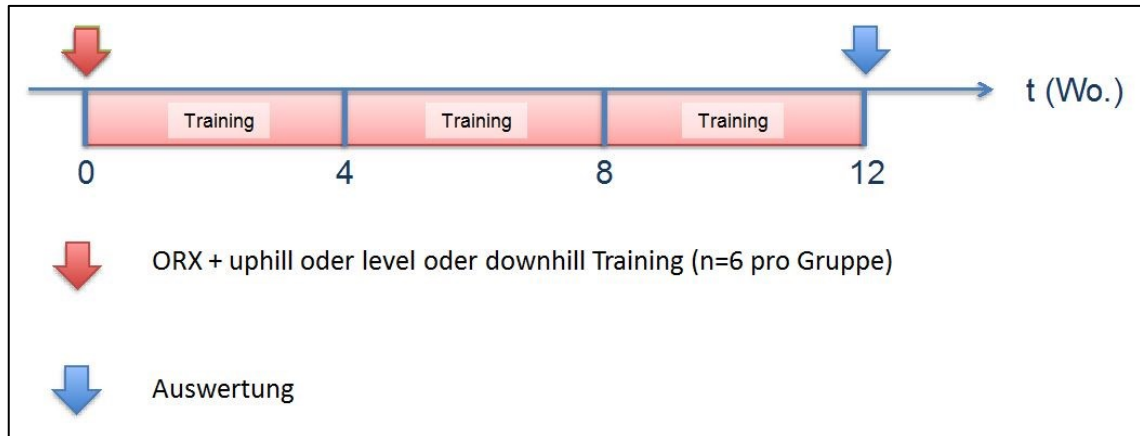
**Abbildung 4:** Ablauf von Studienabschnitt A.

### Studienabschnitt B

In einem Abschnitt B wurden kastrierte Ratten einem 12-wöchigen Lauftraining unterzogen (Abbildung 5). Dabei liefen die Tiere entweder eine Steigung von 10° aufwärts (uphill), horizontal (level) oder ein Gefälle von 10° abwärts (downhill). Daraus ergaben sich folglich 3 neue Gruppen mit jeweils 6 Tieren:

12 Wo uphill ORX	12 Wo level ORX	12 Wo downhill ORX
------------------	-----------------	--------------------

Nach der zwölfwöchigen Trainingsphase wurden diese drei Laufgruppen mit der 12 Wo sham ORX bzw. 12 Wo ORX Gruppe verglichen und der Effekt des Trainings auf den Knochen untersucht.



**Abbildung 5:** Ablauf von Studienabschnitt B.

### Trainingsprotokoll

Alle Tiere der drei Laufgruppen liefen Montag bis Freitag für insgesamt 12 Wochen. Diese 12 Wochen wurden in drei Phasen untergliedert:

- Wochen 1 – 3: „learn to train“ Phase  
In den ersten 3 Wochen wurden die Tiere an das Laufband gewöhnt. In Woche 1 liefen sie 20 Minuten mit einer Geschwindigkeit von 10 m/min. In Woche zwei 30 Minuten mit 15 m/min und in der dritten Woche 40 Minuten mit 20 m/min.
- Wochen 4 – 6: „train to train“ Phase  
In dieser Phase wurde im Intervalltraining (Abbildung 6) die Maximalgeschwindigkeit der jeweiligen Gruppe bestimmt. Dazu wurde am Tag 1 der 4. Woche mit einer Geschwindigkeit von 20 m/min begonnen und an jedem folgenden Tag die Geschwindigkeit um 1 m/min erhöht, bis am Verhalten der Tiere ein Optimum eindeutig zu erkennen war. Daraus ergab sich für die uphill-Gruppe eine Maximalgeschwindigkeit von 28 m/min, für die level-Gruppe 35 m/min und für die downhill-Gruppe 34 m/min.
- Wochen 6 – 12: Trainingsphase  
In den verbliebenen Wochen liefen die Tiere ein Intervalltraining (Abbildung 6) mit der jeweiligen Maximalgeschwindigkeit.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung eines Intervalltrainings. Zunächst liefen die Tiere 4 Minuten lang bei niedriger Geschwindigkeit von 10 m/min. Anschließend wurde innerhalb von 30 Sekunden die Geschwindigkeit stufenlos von 10 m/min auf die jeweilige Maximalgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) erhöht. Es folgte ein zweiminütiges Intervall mit der jeweiligen Maximalgeschwindigkeit. Bei der uphill-Gruppe waren dies 28 m/min, bei der level-Gruppe 35 m/min und bei der downhill-Gruppe 34 m/min. Dieses Intervall wurde fünfmal wiederholt, immer gefolgt von einer vierminütigen Phase bei 10 m/min und der Beschleunigungsphase von 30 Sekunden.

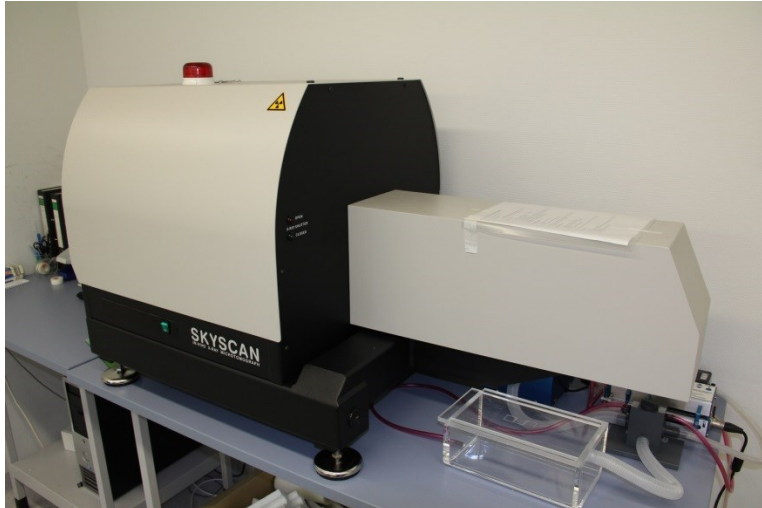
### 3.3 Untersuchungsmethoden

#### 3.3.1 Mikro-Computertomographie ( $\mu$ -CT)

Die linken Tibiae der 54 Tiere wurden einen Tag vor der Analyse aus der Alkohollösung entnommen und über Nacht in Kochsalzlösung (0,9% NaCl) im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurden vor dem Scan die Knochenproben in Frischhaltefolie eingewickelt, um Artefakte infolge von Austrocknung während des Scanvorgangs zu verhindern, und in Röhrchen, die in einem Styroporrahmen fixiert wurden, im  $\mu$ -CT Gerät (SkyScan 1076 in-vivo micro-CT, Firma Bruker, Antwerpen, Belgien) (Abbildung 7) gescannt. Alle Scans wurden mit einer isotropen Voxelgröße von 9  $\mu$ m und einem 0,5 mm Aluminiumfilter bei 71 Kilovolt und 154 Mikroampere durchgeführt. Des Weiteren wurde ein Rotationsschritt (rotation step) von 0,6° bei einer Gesamtrotation von 180° und eine Bildfeld-Mittelwertberechnung (averaging frame) von 3 eingestellt.

Rekonstruktionen der gescannten Knochenproben wurden mit der Software NRecon Version 1.6.6.0 erstellt. Dabei wurde ein Gauss-Filter (Glättung = 2), eine Ring-Artefakt Reduzierung von 6, eine 30-prozentige Korrektur der Strahlauflärung

(beam hardening correction) und eine 20-prozentige Ausblendung von fehlerhaften Pixeln (defect pixel masking) eingestellt. Für die Optimierung der Grauwertdarstellung wurde bei jeder Probe im logarithmisch dargestellten Histogramm ein Minimalwert von 0 und ein Maximalwert von 0,09 eingestellt.



**Abbildung 7**

μ-Computertomograph  
Skyscan 1076 der Firma Bruker

Nach Rekonstruktion des Datensatzes wurde mit der Software CT-Analyser Version 1.12.4.0 das volume of interest (VOI) definiert und die quantitative Analyse durchgeführt.

### **Festlegung des VOI**

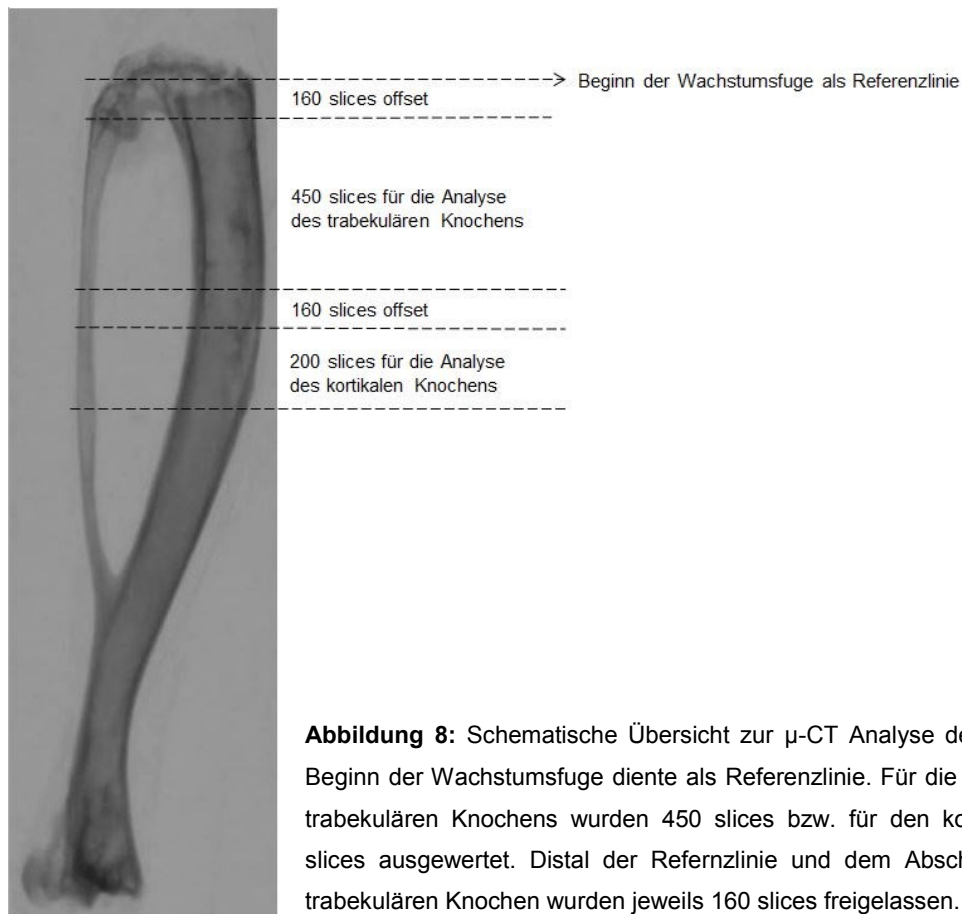
Für die Analyse wurde bei allen Knochen ein bestimmter Bereich (VOI) in der Metaphyse für den trabekulären und für den kortikalen Knochen ein bestimmter Bereich in der Diaphyse definiert (Abbildung 8).

- **Trabekulärer Knochen:**

Als Referenzlinie wurde der Beginn der Wachstumsfuge im Tibiakopf bestimmt. Dafür wurden die nach der Rekonstruktion einzeln vorliegenden Transversalschnitte des Knochens schrittweise durchgeblättert und in der Spongiosa das erstmalige Auftreten der Knorpelstruktur mit geringer Dichte gesucht. Von dieser Referenzlinie aus wurde ein Puffer (offset) von 160 Einzelschnitten (slices) nach distal festgelegt. Die folgenden 450 distalen slices wurden ausgewertet.

- **Kortikaler Knochen:**

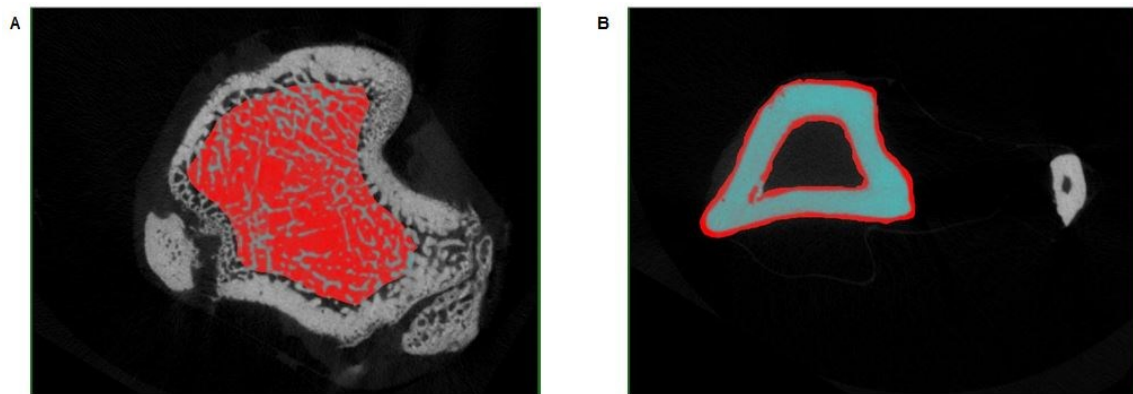
Distal des Bereiches für die Analyse des trabekulären Knochens wurde ein weiterer Puffer von 160 slices festgelegt. Die folgenden 200 distalen slices wurden ausgewertet.



**Abbildung 8:** Schematische Übersicht zur  $\mu$ -CT Analyse der Tibia. Der Beginn der Wachstumsfuge diente als Referenzlinie. Für die Analyse des trabekulären Knochens wurden 450 slices bzw. für den kortikalen 200 slices ausgewertet. Distal der Referenzlinie und dem Abschnitt für den trabekulären Knochen wurden jeweils 160 slices freigelassen.

Innerhalb des VOI wurde die für die Analyse interessante Region (region of interest, ROI) manuell eingezeichnet (Abbildung 9). Die Schwellenwerte (thresholds) für die Binärbilder wurden für die Spongiosa bei 65 und 255 bzw. für die Kortikalis bei 100 und 255 festgelegt. Die Berechnung der Knochenmineraldichte (Bone mineral density, BMD) erfolgte mit Hilfe von zwei Hydroxyapatit-Phantomen bekannter Dichte ( $0,25 \text{ g/cm}^3$  und  $0,75 \text{ g/cm}^3$ ), die mit den oben genannten Einstellungen gescannt und rekonstruiert wurden.

Nach der quantitativen Analyse wurden mit der Software CT Volume Version 2.2.2.2 dreidimensionale Rekonstruktionen des kortikalen und trabekulären VOI angefertigt.



**Abbildung 9:** Exemplarische Darstellung der ROI (roter Bereich) eines slices für den trabekulären (A) und kortikalen Knochen (B). Beide ROI wurden freihändig in der Software CTAnalyser eingezeichnet.

### 3.3.1.1 Definitionen der erhobenen Parameter

Für die quantitative Auswertung der Kortikalis wurde eine 2D-Analyse, für die Spongiosa eine 3D-Analyse durchgeführt. Die 2D-Analyse bezog sich auf die ROI, welche eine ausgewählte Region eines einzelnen Transversalschnittbildes darstellt (Abbildung 9-A und 9-B). Die Berechnungen der 3D-Analyse bezogen sich auf das VOI, was ein dreidimensionales Volumen darstellt und der Summe aller ROIs von aufeinanderfolgenden Schnittbildern entspricht.

Die Berechnung der unten genannten Parameter erfolgte mit dem Programm CT-Analyser der Firma Bruker. Auf die Berechnungsmethoden und Berechnungsalgorithmen sei auf das Herstellermaterial verwiesen (siehe „Morphometric parameters measured by Skyscan™ CT-analyser software“)

Folgende kortikale Knochenparameter wurden ermittelt (2D-Analyse):

- B.Ar (Mean total crossectional bone area)  
B.Ar gibt die durchschnittliche Gesamtknochenfläche der eingezeichneten ROI für alle slices innerhalb des VOI in mm<sup>2</sup> an.
- T.Ar (Mean total crossectional tissue area)  
T.Ar gibt die durchschnittliche Gesamtquerschnittsfläche der ROI für alle slices innerhalb des VOI in mm<sup>2</sup> an.
- B.Ar/T.Ar  
B.Ar/T.Ar Gibt die Ratio der Gesamtknochenfläche zur Gesamtquerschnittsfläche in % an. Dies Entspricht dem prozentualen Knochenanteil an der gesamten Messfeldfläche.

- Cortical Tb.Th (Cortical Trabecular thickness)

Cortical Tb.Th gibt die durchschnittliche kortikale Schichtdicke in  $\mu\text{m}$  an.

Für die Berechnung wurde eine Modellannahme zugrunde gelegt. Auf der Grundlage des „Parallelplattenmodells“ ließ sich der Parameter wie folgt berechnen [Parfitt et al. 1987]:

$$\text{Tb.Th} = \frac{2}{\text{BS/BV}}$$

wobei BS/BV die Ratio aus Knochenoberfläche und Knochenvolumen ist.

- BMD (Bone mineral density, Knochenmineraldichte)

BMD ist ein Maß für die Materiemenge pro Rauminhalt im Knochen. Sie ist definiert als die volumetrische Dichte von Hydroxyapatit in  $\text{g/cm}^3$ .

Folgende trabekuläre Knochenparameter wurden ermittelt (3D-Analyse):

- BV (Bone volume)

BV gibt das Gesamtknochenvolumen der ROI für alle slices innerhalb des VOI in  $\text{mm}^3$  an. Dies entspricht dem Gesamtvolumen von binarisierten Objekten innerhalb des VOI.

- TV (Tissue volume)

TV gibt das Gesamtvolumen des Gewebes der ROI für alle slices innerhalb des VOI in  $\text{mm}^3$  an. Dies entspricht dem Gesamtvolumen des VOI.

- BV/TV (Bone volume fraction)

BV/TV misst das Verhältnis von Knochenvolumen zum gemessenen Gesamtgewebe in %. Dies entspricht dem prozentualen Anteil des VOI, der von festen, binarisierten Objekten ausgefüllt ist.

- Tb.N (Trabecular number)

Tb.N gibt die Zahl der Trabekel pro mm an.

Die Trabekelanzahl bedeutet die Anzahl der Unterbrechungen pro mm durch das VOI auf einer randomisierten linearen Achse. Je höher also die trabekuläre Anzahl, desto mehr Unterbrechungen auf der linearen Achse durch die Spongiosa.

- Trabecular Tb.Th

Trabecular Tb.Th beschreibt die Dicke der Trabekel in  $\mu\text{m}$ .

Dieser Berechnung liegt eine Methode zugrunde, bei der Kugeln in die binarisierten Voxel, also die Knochenstruktur, eingebettet werden. Dabei ist die lokale Dicke als der Durchmesser der größten Kugel festgelegt, die vollständig innerhalb der knö-



chernem Struktur liegt. Der Durchschnitt aller gemessenen Kugeldurchmesser ergibt die Trabekeldicke.

- Tb.Sp (Trabecular separation)

Tb.Sp ist ein Maß für den Abstand zwischen den Trabekeln in mm.

Die Berechnung erfolgte mit derselben Methode wie bei der Trabekeldicke. Allerdings werden die Kugeln statt in die knöchernen Voxel in jene Bildeinheiten eingebettet, die gemäß dem festgelegten threshold keinen Knochen repräsentieren. Der Trabekelabstand gibt dementsprechend die Dicke der Markräume an.

- DA (Degree of anisotropy)

DA stellt ein Maß für trabekuläre Vorzugsrichtungen dar, wobei ein Wert von 0 völlige Isotropie und ein Wert von 1 völlige Anisotropie bedeutet. Knochen reagiert aktiv auf einwirkende Kräfte und passt sich der Beanspruchung funktionell an. Die spongiöse Struktur des Knochens ist somit anisotrop, da sie ihre Anordnung mit der Richtung der Krafteinwirkung ändert. Ist sein Wert also 0, so gibt es keine bestimmte Vorzugsrichtung, die Trabekel verteilen sich isotrop.

Bestimmt wurde DA durch die „Mean Intercept Length“ (MIL) Methode und die „Eigenanalyse“. MIL gibt den durchschnittlichen Abstand zwischen zwei Knochen/Mark-Schnittstellen an. Für die Berechnung wurden parallele Testlinien in verschiedenen Richtungen und aus vielen dreidimensionalen Winkeln über das VOI gelegt. Die Testlinienlänge wurde daraufhin mit der Anzahl der Knochenabschnitte dividiert, auf die die Testlinie trifft. In einem nächsten Schritt wurde von der Software die dreidimensionale Verteilung der Testlinien als ein Ellipsoid visualisiert. Alle Linien innerhalb des Ellipsoids schneiden sich in einem Punkt und die Länge jeder Linie entspricht der Knochenphase der Testlinie. Dies kann man sich vereinfacht als ein Nadelkissen mit Nadeln in allen Richtungen und verschiedenen Längen vorstellen. In einem letzten Schritt wurde die Struktur dieses Ellipsoids mit der sog. Eigenanalyse beschrieben. Dies geschieht zum einen mit sog. Eigenvektoren, die die drei senkrecht aufeinander stehenden Achsen des Ellipsoids charakterisieren und zum anderen mit drei sog. Eigenwerten, die Kennziffern der MIL-Werte für jede der drei Achsen sind. Der Anisotropiegrad ist dimensionslos und kann mathematisch wie folgt ausgedrückt werden:

$$DA = \left[ 1 - \left( \frac{\min \text{Eigenwert}}{\max \text{Eigenwert}} \right) \right]$$

wobei min Eigenwert der kleinste und max Eigenwert der größte Eigenwert ist.

Näheres hierzu in Harrigan und Mann 1984 [Harrigan und Mann 1984].

- SMI (Structure model index)

SMI beschreibt die dreidimensionale Struktur der Trabekel. Er kann Werte zwischen 0 und 3 annehmen, wobei 0 für eine ideale Platten- und 3 für eine ideale Stabstruktur steht. Diese zwei Formen sind allerdings Ideale. In der Realität besteht ein fließender Übergang und die Struktur für ein trabekuläres Netzwerk liegt dazwischen, wobei mit zunehmendem Alter ein mehr plattenähnliches Netzwerk in ein mehr stabähnliches übergeht [Engelke et al. 1999].

Die Berechnung des SMI basiert auf der Erweiterung von Voxeln, d.h. dem Hinzufügen einer Voxeldicke auf alle binarisierten Objektoberflächen [Hildebrand und Rüegsegger 1997]. Der SMI wird wie folgt abgeleitet:

$$\text{SMI} = 6 \cdot \left( S' \cdot \frac{V}{S^2} \right)$$

wobei  $S$  die Objektoberfläche vor der Erweiterung ist und  $S'$  die Veränderung der Oberfläche nach der Erweiterung ist.  $V$  ist das ursprüngliche Objektvolumen vor der Erweiterung. Dieser Parameter ordnet die Struktur nach ihrer Konvexität einem bestimmten Modelltypus zu. Ideale, flache Platten haben einen SMI von 0, da es keine Veränderungen der Oberfläche bei Aufweiten der Platten gibt. Ideale, zylindrische Stäbe haben einen SMI von 3, da eine Zunahme der Oberfläche mit Dilatation der Stäbe erfolgt. Da der SMI die relative Zusammensetzung des Knochens aus Platten und Stäben angibt, ist er dimensionslos.

- Conn.D (Connectivity density)

Die Konnektivität stellt ein Maß für die Vernetzung des trabekulären Geflechts dar. Sie gibt die maximale Anzahl von Verbindungen an, die innerhalb des Netzwerkes z.B. durch Mikrofrakturierungen unterbrochen werden können, ohne das Netz als Ganzes in zwei nicht mehr miteinander verbundene Teile zu unterbrechen. Sie wird auf das untersuchte Volumen in  $\text{mm}^3$  normiert und als Konnektivitätsdichte (Conn.D) angegeben. Häufig wird sie auch mit der Euler-Nummer gleichgesetzt bzw. dargestellt, da auf Basis dieser Nummer die Verbindungen gezählt und wiedergegeben werden können. Die Euler-Nummer ist eine Konstante ( $\chi$ ), die zur Kalkulation der Topologie von räumlichen Objekten herangezogen wird und wie folgt ausgedrückt:

$$\chi = \beta_0 - \beta_1 + \beta_2$$

wobei  $\beta_0$  die Anzahl der Objekte,  $\beta_1$  die Konnektivität (dimensionslos) und  $\beta_2$  die Anzahl der eingeschlossenen Hohlräume ist. Die Konnektivitätsdichte (Conn.D) ist der

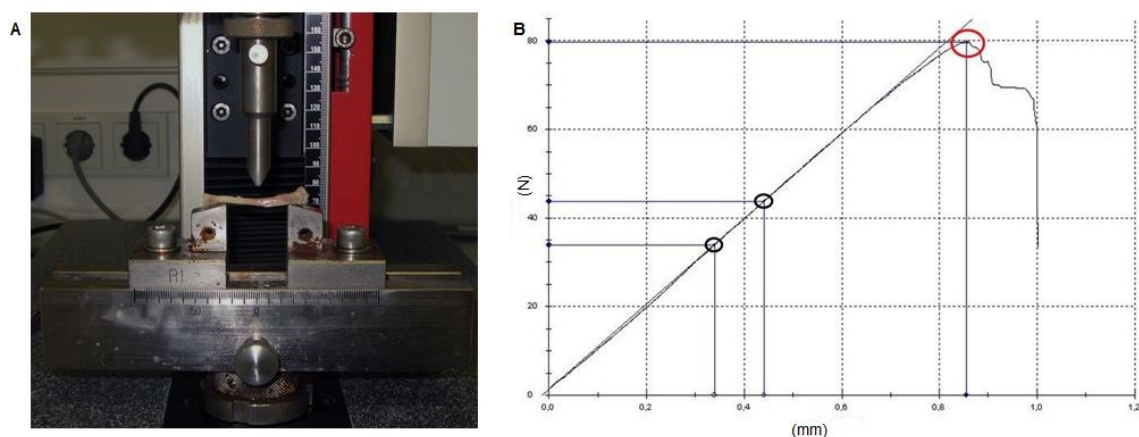
Quotient aus der Konnektivität  $\beta_1$  und dem VOI in  $\text{mm}^3$ . Näheres hierzu in Odgaard und Gundersen 1993 [Odgaard und Gundersen 1993].

- BMD (Bone mineral density, Knochenmineraldichte)

BMD ist ein Maß für die Materiemenge pro Rauminhalt im Knochen. Sie ist definiert als die volumetrische Dichte von Hydroxyapatit in  $\text{g}/\text{cm}^3$ .

### 3.3.2 Biomechanische Testung

Die biomechanische Stabilität wurde in Kooperation mit dem Universitätsklinikum des Saarlandes am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie gemessen. Hierfür wurden die Tibiae mittels 3-Punkt-Biege-Messung unter Verwendung des Mini-Zwick Z 2.5 Apparats (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) untersucht (Abbildung 10-A). Die Enden der Tibiae wurden bei einer Einspannlänge von 26 mm auf zwei Auflagen positioniert. Der Prüfstempel drückte mit einer konstanten Geschwindigkeit von 10 mm/min auf die Schaftmitte, bis dieser brach. Sämtliche Messwerte wurden automatisch mit Hilfe der dazugehörigen Software testXpert (Zwick, Version 12.0) aufgezeichnet und in ein Kraft-Weg-Diagramm übertragen (Abbildung 10-B). Anhand der digital aufgezeichneten Diagramme konnte die maximale Haltekraft in Newton (N) abgelesen, bzw. die Steifigkeit in N/mm im linearen Anteil des Kraft-Weg-Diagramms bestimmt werden.



**Abbildung 10:** Versuchsanordnung der 3-Punkt-Biege-Messung (A) und exemplarische Darstellung eines Kraft-Weg-Diagrammes (B). Aus dem Diagramm konnte die maximale Haltekraft (roter Kreis) in N abgelesen und die Steifigkeit im linearen Abschnitt der Kurve zwischen 2 Punkten (schwarze Kreise) in N/mm bestimmt werden. Die Steifigkeit entspricht der mathematischen Steigung einer Geraden.

### **3.3.3 Laboranalyse**

Die Bestimmung der Testosteronkonzentrationen im Serum wurde mit einem Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Lesegerät (Victor™ X3, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) unter Verwendung des dazugehörigen ELISA kit [Testosterone ELISA Kit (ab108666), Abcam Ltd, Cambridge, England] am Institut für Experimentelle Chirurgie in Rostock durchgeführt.

### **3.4 Statistische Analyse**

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Bei Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse [„one way analysis of variance“ (1-way-ANOVA)]. Sämtliche statistische Tests erfolgten unter Verwendung der Software SPSS 20 (IBM SPSS Statistics, IBM, Armonk, NY, USA). Bei der Prüfung wurden Unterschiede mit  $p < 0,05$  als signifikant angesehen. Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA) in Diagrammen dargestellt.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Allgemeine Beobachtungen**

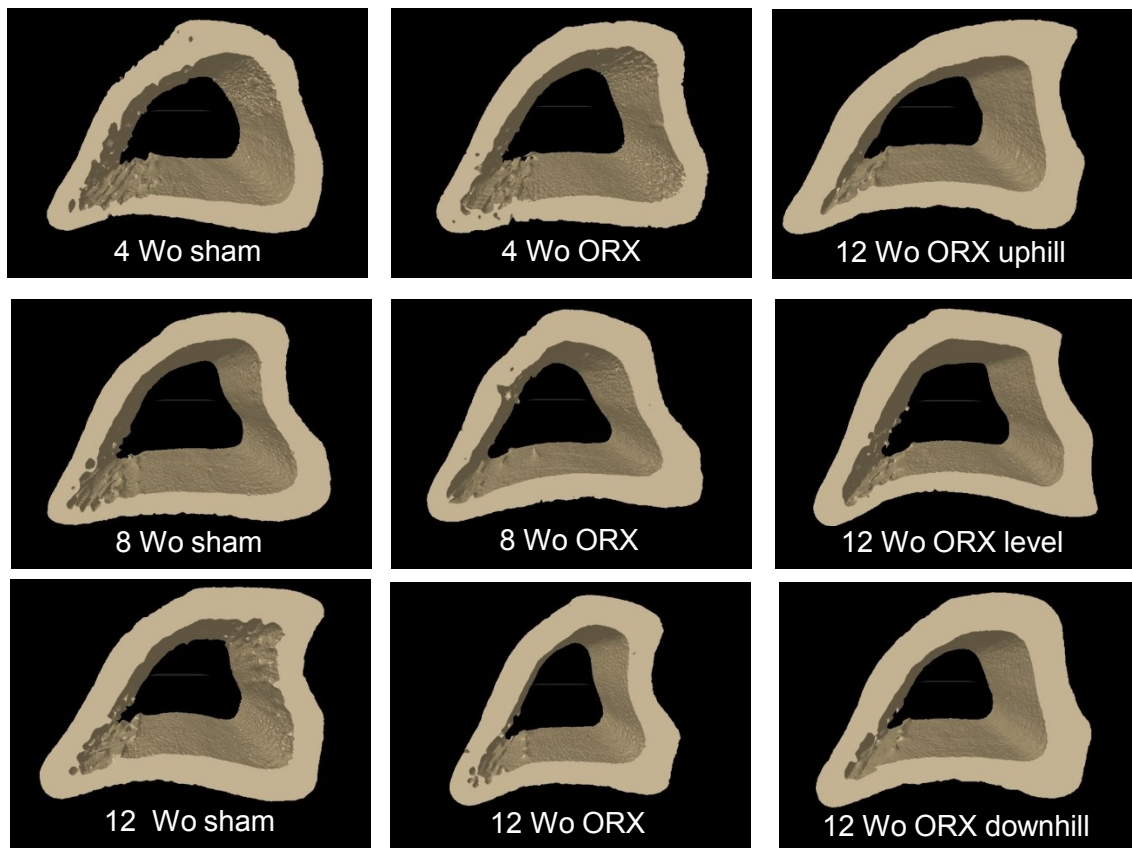
Alle Versuchstiere wachten nach der Kastration komplikationslos auf. Während der ersten postoperativen Tage verhielten sich die Tiere ruhiger als sonst, präsentierten sich jedoch in gutem Allgemein- und Ernährungszustand. Die Wasser- und Futteraufnahme war regelrecht, sodass keine wesentlichen Gewichtsabnahmen verzeichnet wurden. Die Operationswunde heilte zeitgerecht und war reizlos, trocken und ohne Zeichen einer lokalen Infektion.

### **4.2 $\mu$ -CT**

#### **4.2.1 Kortikaler Knochen**

##### **4.2.1.1 Qualitative Analyse**

In der qualitativen Analyse zeigten sich anhand der dreidimensionalen Rekonstruktionen keine wesentlichen morphologischen Veränderungen der Kortikalis (Abbildung 11). Die Kastration hatte zu jedem Zeitpunkt keinen sichtbaren Effekt auf die kortikale Struktur. Ähnlich verhielt es sich nach dem Lauftraining. Sowohl uphill, level, als auch downhill Training führte zu keinem wesentlichen Zuwachs der kortikalen Knochenmasse nach Kastration.



**Abbildung 11:** Repräsentative dreidimensionale Rekonstruktionen des kortikalen Knochens. Dargestellt sind jeweils Transversalschnitte der diaphysären linken Tibia von sham-kastrierten (sham) und kastrierten (ORX) Tieren nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie von kastrierten Tieren nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Die Ansicht ist jeweils von proximal.

#### 4.2.1.2 Quantitative Analyse

Die Beobachtungen aus der qualitativen Analyse ließen sich anhand der im Folgenden beschriebenen kortikalen Parameter quantifizieren.

Die durchschnittliche Gesamtquerschnittsfläche (T.Ar) stieg bei den kastrierten, als auch bei den sham-kastrierten Versuchstieren im Verlauf an und zeigte nach 8 und 12 Wochen bei den kastrierten Tieren signifikant geringere Werte als bei den sham-kastrierten Tieren. Nach 4 Wochen ist noch kein statistisch relevanter Abfall bei den kastrierten Tieren zu beobachten gewesen. Bei den drei Laufgruppen zeigte die Gesamtquerschnittsfläche keinen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den kastrierten Tieren, die nicht gelaufen sind. Uphill-, level- und 12-Wo-ORX Tiere hatten signifikant geringere Werte als die sham-kastrierten Tiere. Lediglich die downhill-Gruppe zeigte

keinen statistisch relevanten Unterschied zur sham-Gruppe. Zusätzlich konnten bei den downhill-Tieren signifikant höhere Werte im Vergleich zur level-Gruppe beobachtet werden (Tabelle 1).

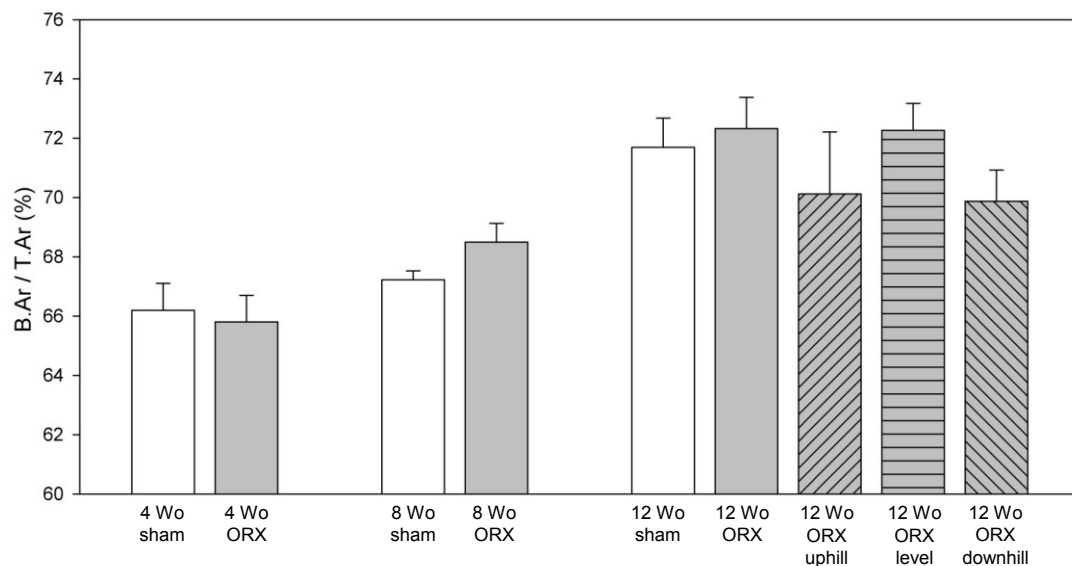
	T.Ar (mm <sup>2</sup> )	B.Ar (mm <sup>2</sup> )	cortical Tb.Th (µm)
4 Wo sham	11,52 ± 0,06	7,63 ± 0,13	330,80 ± 8,30
4 Wo ORX	10,80 ± 0,36	7,09 ± 0,16	317,40 ± 8,00
8 Wo sham	12,39 ± 0,18	8,33 ± 0,09	367,40 ± 6,90
8 Wo ORX	11,09 ± 0,34*	7,59 ± 0,23*	370,60 ± 5,40
12 Wo sham	12,52 ± 0,30	8,97 ± 0,17	398,00 ± 10,10
12 Wo ORX	11,31 ± 0,48*	8,16 ± 0,28*	398,80 ± 9,00
12 Wo ORX uphill	11,49 ± 0,48*	8,02 ± 0,21*	407,80 ± 8,90
12 Wo ORX level	10,81 ± 0,44*	7,79 ± 0,23*	386,00 ± 14,20
12 Wo ORX downhill	11,81 ± 0,25 <sup>§</sup>	8,26 ± 0,28*	399,90 ± 13,70

**Tabelle 1:** Veränderungen der gesamten Querschnittsfläche des kortikalen Knochens (T.Ar, „tissue area“) in mm<sup>2</sup>, der durchschnittlichen kortikalen Knochenfläche (B.Ar, „bone area“) in mm<sup>2</sup> und der durchschnittlichen kortikalen Schichtdicke (cortical Tb.Th) in µm bei kastrierten (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierten (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tieren nach 4, 8 und 12 Wochen, sowie bei kastrierten Tieren nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert ± SEM; one-way ANOVA; \* p<0,05 vs. sham, § p<0,05 vs. 12-Wo-ORX-level.

Die Knochenfläche (B.Ar) stieg bei den kastrierten, als auch bei den sham-kastrierten Versuchstieren im Verlauf an und zeigte nach 8 und 12 Wochen bei den kastrierten Tieren signifikant geringere Werte als bei den sham-kastrierten Tieren. Nach 4 Wochen ist noch kein statistisch relevanter Abfall bei den kastrierten Tieren zu beobachten gewesen. Bei den Laufgruppen zeigten sich keine signifikant höheren Werte im Vergleich zu den kastrierten, untrainierten Tieren. Trainierte Tiere hatten signifikant geringere Werte als sham-kastrierte Tiere (Tabelle 1).

Obwohl bei den Parametern T.Ar und B.Ar signifikante Unterschiede auftraten, spiegelte sich das bei der Berechnung der Ratio von der Knochenfläche zur Gesamtfläche (B.Ar/T.Ar) nicht wider. Dort konnte bei den kastrierten und sham-kastrierten Tieren im Verlauf ein leichter Anstieg beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch relevant. Auch Lauftraining konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bewirken. Ein Anstieg

im Vergleich zu den ruhenden, kastrierten Tieren war nicht zu beobachten (Abbildung 12).

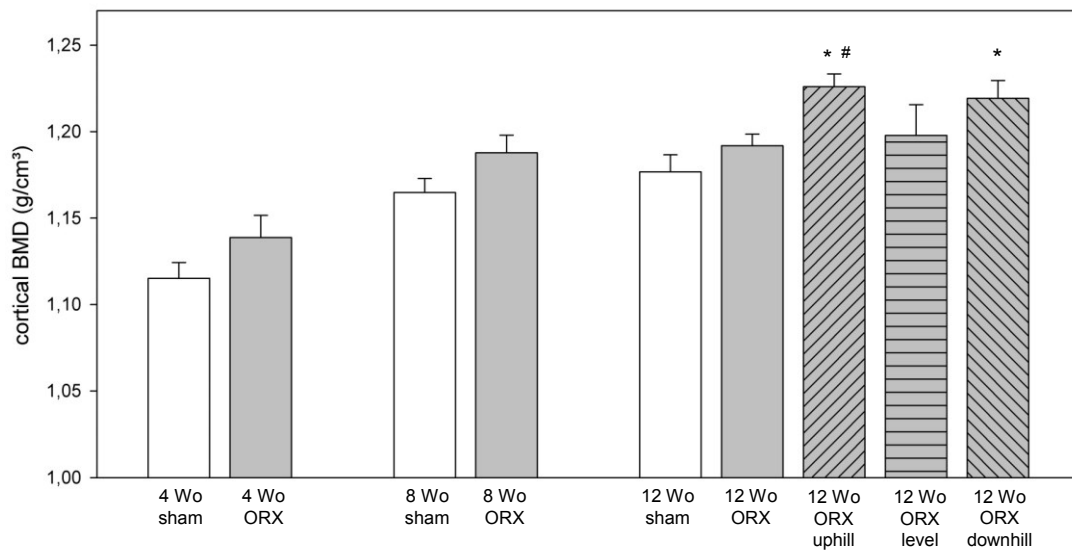


**Abbildung 12:** Ratio von der Knochenfläche zur Gesamtfläche (B.Ar/T.Ar) der Kortikalis in %. Dargestellt sind kastrierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierte Tiere (sham, n=6 pro Zeitpunkt) nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie kastrierte Tiere nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM; one-way ANOVA;

Die kortikale Schichtdicke (cortical Tb.Th) nahm mit zunehmendem Alter höhere Werte an. Zwischen den kastrierten und sham-kastrierten Tieren bestand jedoch zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Der Vergleich der drei Laufgruppen mit der 12-Wo-sham und 12-Wo-ORX-Gruppe erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 1).

Ebenso konnte bei der kortikalen Knochenmineraldichte (cortical BMD) zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den kastrierten und sham-kastrierten Tieren festgestellt werden. Die Werte der ORX- und sham-ORX-Gruppe blieben nach 8 und 12 Wochen nahezu unverändert. Bei den Laufgruppen zeigte die uphill-Gruppe eine höhere Knochenmineraldichte im Vergleich zu den ruhenden, kastrierten Tieren. Durch das uphill und downhill Laufen konnten sogar signifikant höhere Werte als bei der Kontroll-sham-Gruppe erreicht werden (Abbildung 13).



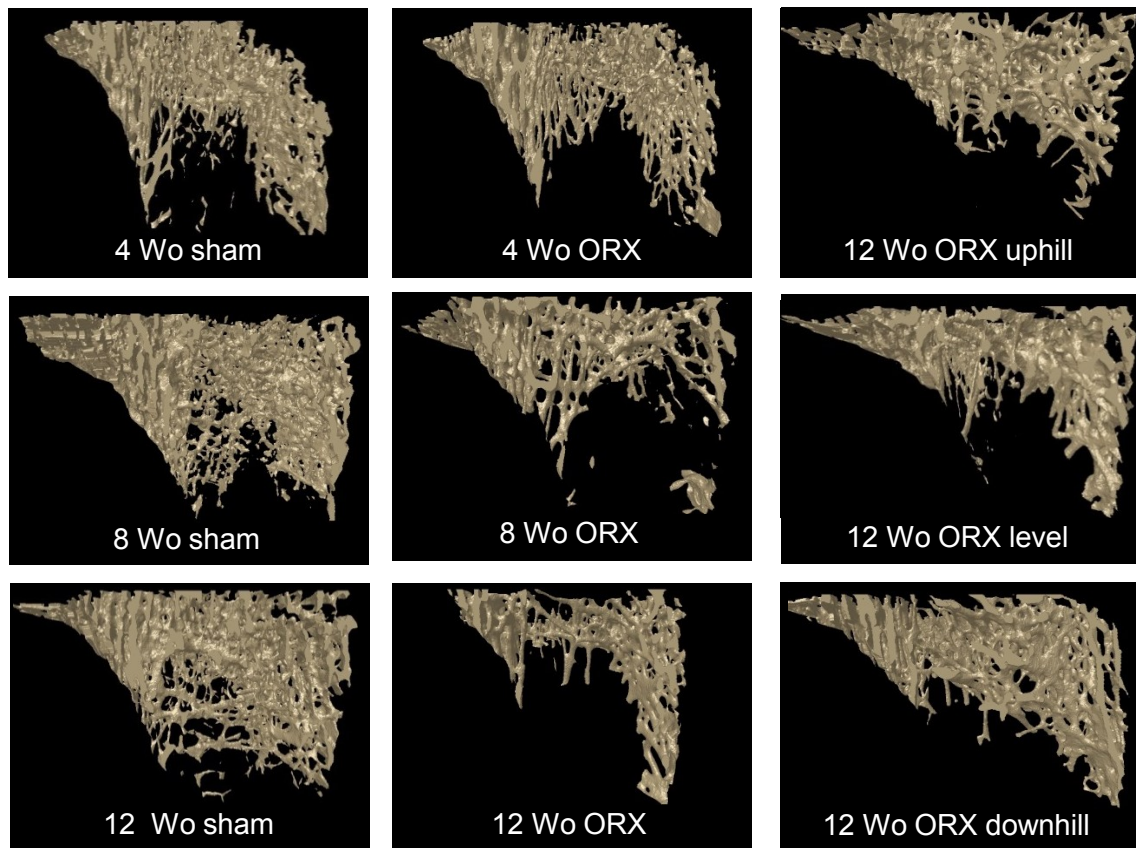


**Abbildung 13:** Knochenmineraldichte (BMD, „bone mineral density“) in g/cm<sup>3</sup> des kortikalen Knochens. Dargestellt sind kastrierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierte Tiere (sham, n=6 pro Zeitpunkt) nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie kastrierte Tiere nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM; one-way ANOVA; \* p<0,05 vs. sham, # p<0,05 vs. 12-Wo-ORX.

## 4.2.2 Trabekulärer Knochen

### 4.2.2.1 Qualitative Analyse

Anhand der dreidimensionalen Rekonstruktionen der analysierten Spongiosa lässt sich der knochenabbauende Effekt der Kastration deutlich erkennen. Die kastrierten Tiere zeigten zu jedem Zeitpunkt weniger Trabekel als die sham-kastrierten Tiere, wobei das Ausmaß mit zunehmender Dauer anstieg. Außerdem bewirkte das Lauftraining einen Wiederaufbau der durch die Kastration abnehmenden Spongiosa. Innerhalb der Laufgruppen ließ sich qualitativ kein deutlicher Unterschied beobachten. Die level-Gruppe zeigte etwas weniger Trabekel als die uphill- und downhill-Gruppe (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Repräsentative dreidimensionale Rekonstruktionen des trabekulären Knochens. Dargestellt sind jeweils Schnitte in der Mediansagittalebene der metaphysären linken Tibia von sham-kastrierten (sham) und kastrierten (ORX) Tieren nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie von kastrierten Tieren nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen.

#### 4.2.2.2 Quantitative Analyse

Die Beobachtungen aus der qualitativen Analyse ließen sich anhand der im Folgenden beschriebenen trabekulären Parameter quantifizieren.

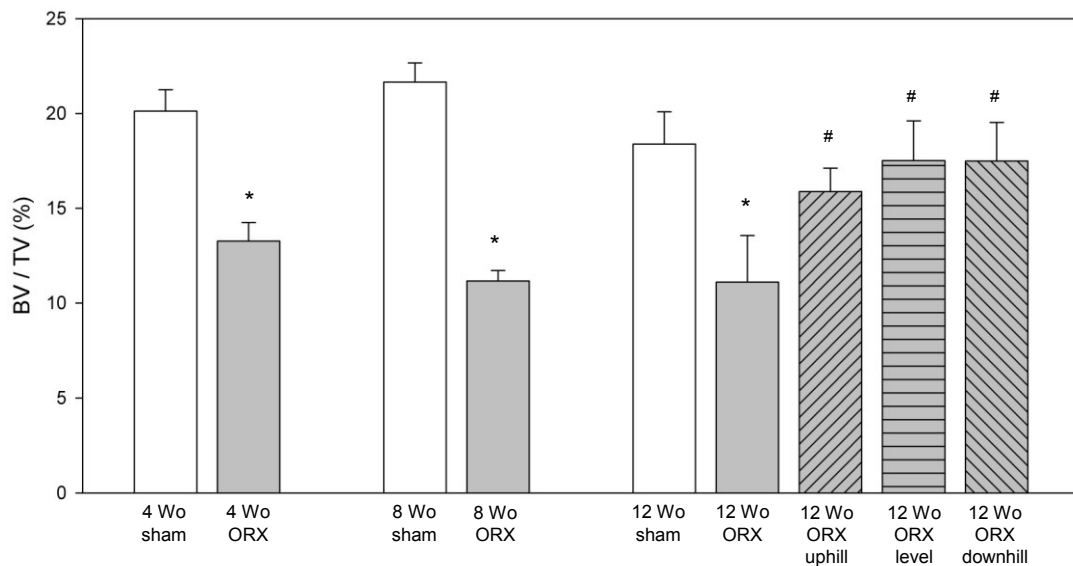
Die Messung des Knochenvolumens (BV) ergab zu jedem Zeitpunkt signifikant geringere Werte bei den kastrierten Tieren im Vergleich zu den sham-kastrierten Tieren. Das Knochenvolumen zeigte bei der downhill-Gruppe einen Anstieg um ca. 65% im Vergleich zu der 12-Wo-ORX-Gruppe. Die höheren Werte bei den uphill- und level-Tieren waren statistisch nicht signifikant (Tabelle 2).

	BV (mm <sup>3</sup> )	TV (mm <sup>3</sup> )	trabecular Tb.Th (µm)
4 Wo sham	14,84 ± 0,85	74,01 ± 2,36	113,90 ± 2,80
4 Wo ORX	9,05 ± 1,30*	66,54 ± 5,27	109,50 ± 1,50
8 Wo sham	17,28 ± 1,02	79,63 ± 2,31	115,90 ± 2,80
8 Wo ORX	6,69 ± 0,58*	59,99 ± 4,30*	119,20 ± 2,10
12 Wo sham	13,20 ± 1,51	71,48 ± 4,88	122,00 ± 3,10
12 Wo ORX	7,30 ± 2,22*	62,47 ± 6,51	116,40 ± 3,60
12 Wo ORX uphill	9,87 ± 1,26	61,77 ± 4,42	127,60 ± 2,60 <sup>#</sup>
12 Wo ORX level	11,32 ± 2,14	62,80 ± 5,83	123,50 ± 5,70
12 Wo ORX downhill	12,028 ± 2,09 <sup>#</sup>	66,67 ± 4,41	124,80 ± 5,20

**Tabelle 2:** Veränderungen des trabekulären Knochenvolumens (BV, „bone volume“) in mm<sup>3</sup>, des gesamten Gewebenvolumens (TV, „tissue volume“) in mm<sup>3</sup> und der Trabekeldicke (trabecular Tb.Th) in µm bei kastrierten (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierten (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tieren nach 4, 8 und 12 Wochen, sowie bei kastrierten Tieren nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert ± SEM; one-way ANOVA; \* p<0,05 vs. sham, # p<0,05 vs. 12-Wo-ORX.

Die Werte des gesamten Gewebenvolumens (TV) zeigten bei kastrierten Tieren lediglich nach 8 Wochen signifikant niedrigere Werte als bei sham-kastrierten Tieren. Der Vergleich der 3 Laufgruppen mit der 12-Wo-sham und 12-Wo-ORX-Gruppe ergab keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 2).

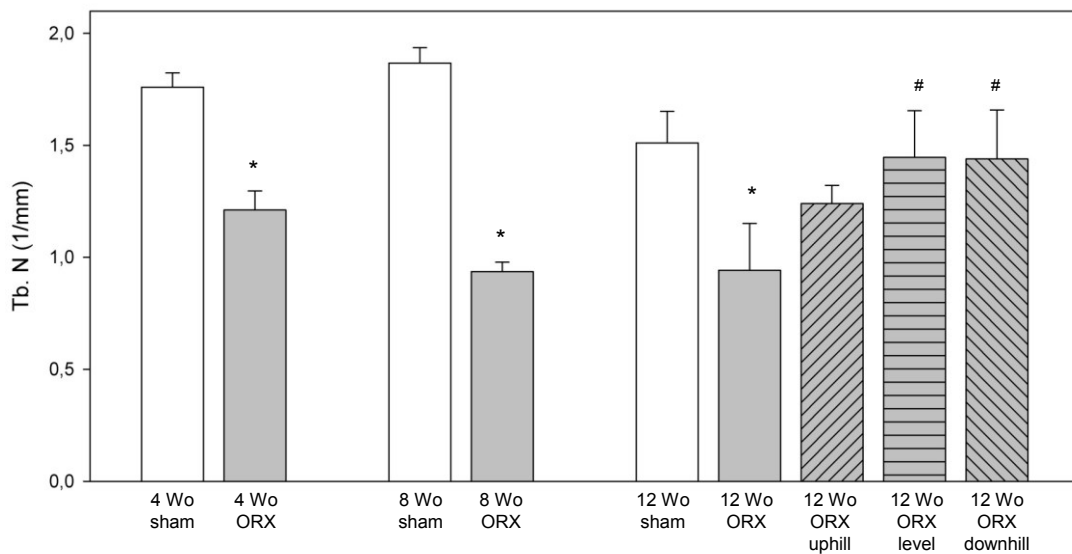
Zu allen Zeitpunkten lag der prozentuale Anteil des Knochens am gemessenen Gesamtgewebe (BV/TV) bei den kastrierten Tieren signifikant niedriger als bei den sham-kastrierten Tieren. Alle trainierten Tiere zeigten signifikant mehr anteiliges Knochengewebe als die untrainierten, kastrierten Tiere. Der Anstieg gegenüber der 12-Wo-ORX-Gruppe betrug bei der uphill-Gruppe ca. 43%, bei der level-Gruppe ca. 58% und bei der downhill-Gruppe ca. 57%. Durch das Training in jeder der 3 Laufmodalitäten konnten zudem annähernd die Kontrollwerte der sham-kastrierten Tiere erreicht werden (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Ratio von Knochenvolumen zum gesamten Gewebenvolumen (BV/TV) in % der Spongiosa. Dargestellt sind kastrierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierte Tiere (sham, n=6 pro Zeitpunkt) nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie kastrierte Tiere nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM; one-way ANOVA; \*  $p < 0,05$  vs. sham, #  $p < 0,05$  vs. 12-Wo-ORX.

Bei der Anzahl der Trabekel (Tb.N) wurde eine ähnliche Kinetik wie bei der trabekulären Knochen-Gewebe-Fraktion festgestellt. Kastrierte Tiere hatten zu jedem Zeitpunkt weniger Trabekel pro mm als sham-kastrierte Tiere. Bei den Tieren, die level und downhill liefen, konnten signifikant mehr Trabekel pro mm als bei untrainierten, kastrierten Tieren beobachtet werden. Der Anstieg gegenüber der 12-Wo-ORX-Gruppe war mit ca. 54% bei der level-Gruppe und ca. 53% bei der downhill-Gruppe in etwa gleich. Zudem konnten durch jede Trainingsmodalität annähernd die Kontrollwerte der sham-kastrierten Tiere erreicht werden (Abbildung 16).

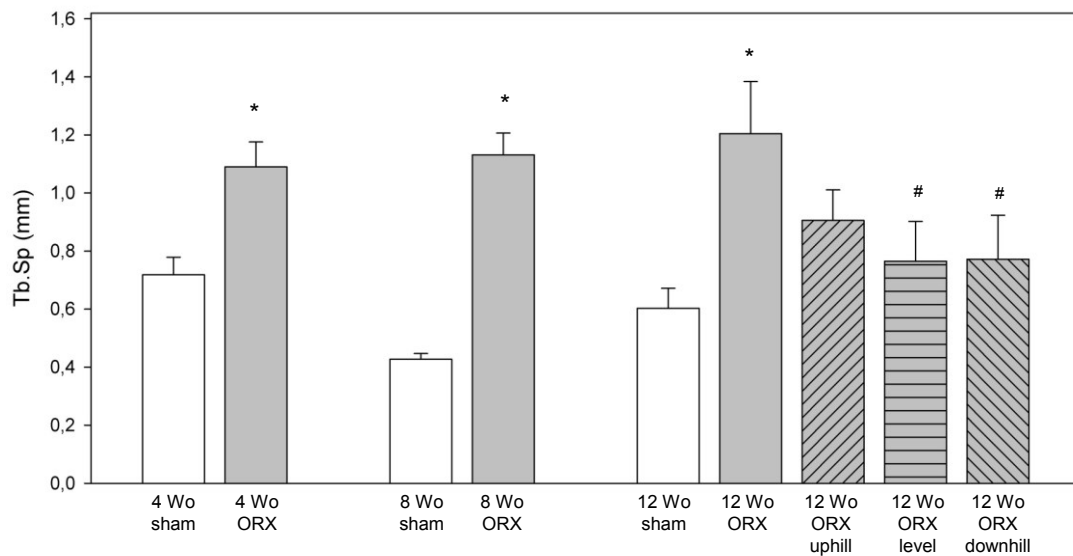
Interessanterweise konnten bei der trabekulären Dicke (Tb.Th) im Gegensatz zur Trabekelanzahl keine signifikanten Unterschiede zwischen kastrierten und sham-kastrierten Tieren nach 4, 8 und 12 Wochen beobachtet werden. Tiere der uphill-Gruppe hatten um ca. 10% dickere Trabekel als untrainierte Tiere aus der 12-Wo-ORX-Gruppe. Die Trabekeldicke der level- und downhill-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der 12-Wo-ORX-Gruppe (Tabelle 2)



**Abbildung 16:** Veränderungen der trabekulären Anzahl (Tb.N, „trabecular number“) pro mm. Dargestellt sind kastrierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierte Tiere (sham, n=6 pro Zeitpunkt) nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie kastrierte Tiere nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM; one-way ANOVA; \*  $p < 0,05$  vs. sham, #  $p < 0,05$  vs. 12-Wo-ORX.

Wie bereits gezeigt, führt die Kastration zu einer Abnahme der Trabekelanzahl. Dementsprechend weisen die intertrabekulären Abstände (Tb.Sp) einen gegenläufigen Trend auf und sind bei den kastrierten Tieren zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als bei den sham-kastrierten Versuchstieren. Aus den drei Laufgruppen hatten Tiere der level- und downhill-Gruppe signifikant geringere intertrabekuläre Abstände als Tiere aus der 12-Wo-ORX-Gruppe. Dabei war der prozentuale Unterschied zu den untrainierten, kastrierten Tieren annähernd gleich (ca. 57% geringere Abstände bei der level-Gruppe und ca. 56% geringere Abstände bei der downhill-Gruppe). Außerdem konnten durch das Training die Abstände annähernd auf die Kontrollwerte der sham-kastrierten Tiere reduziert werden (Abbildung 17).

Im Gegensatz dazu wirkte sich die Kastration nicht auf den Anisotropiegrad (DA) der Trabekel aus. Zwischen kastrierten und sham-kastrierten Tieren bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Ebenso konnte anhand des Anisotropiegrades kein Einfluss von Lauftraining auf die Spongiosastruktur abgeleitet werden. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Laufgruppen und der 12-Wo-ORX-Gruppe. Tiere aus der uphill-Gruppe zeigten deutlich geringere Werte als sham-kastrierte Tiere (Tabelle 3).



**Abbildung 17:** Intertrabekuläre Abstände (Tb.Sp, „trabecular separation“) in mm. Dargestellt sind kastrierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierte Tiere (sham, n=6 pro Zeitpunkt) nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie kastrierte Tiere nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM; one-way ANOVA; \*  $p < 0,05$  vs. sham, #  $p < 0,05$  vs. 12-Wo-ORX.

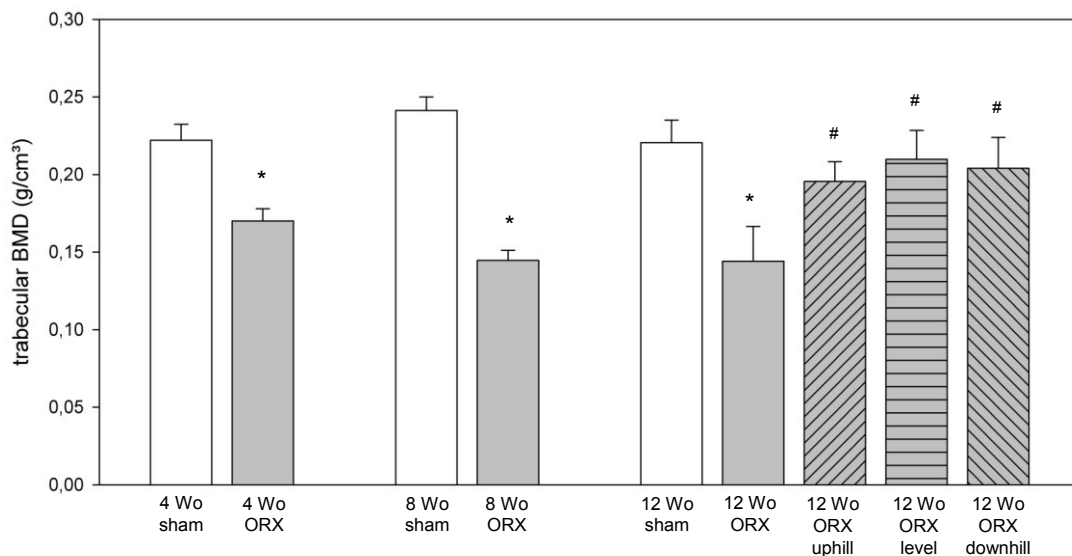
	DA (o. D.)	SMI (o. D.)	Conn.D (1/mm <sup>3</sup> )
4 Wo sham	0,65 $\pm$ 0,01	1,42 $\pm$ 0,05	48,38 $\pm$ 1,71
4 Wo ORX	0,67 $\pm$ 0,01	1,84 $\pm$ 0,07*	31,76 $\pm$ 2,01*
8 Wo sham	0,60 $\pm$ 0,01	1,64 $\pm$ 0,06	49,49 $\pm$ 2,09
8 Wo ORX	0,61 $\pm$ 0,02	2,02 $\pm$ 0,05*	21,91 $\pm$ 1,41*
12 Wo sham	0,60 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,10	36,34 $\pm$ 4,49
12 Wo ORX	0,58 $\pm$ 0,01	2,06 $\pm$ 0,13*	22,96 $\pm$ 5,09*
12 Wo ORX uphill	0,54 $\pm$ 0,03*	1,81 $\pm$ 0,03 <sup>#</sup>	27,58 $\pm$ 2,52
12 Wo ORX level	0,56 $\pm$ 0,02	1,78 $\pm$ 0,06 <sup>#</sup>	35,82 $\pm$ 6,58 <sup>#</sup>
12 Wo ORX downhill	0,57 $\pm$ 0,02	1,83 $\pm$ 0,07 <sup>#</sup>	31,84 $\pm$ 6,32

**Tabelle 3:** Veränderungen des Anisotropiegrades (DA), des Strukturmodellindex (SMI) und der Konnektivitätsdichte in mm<sup>-3</sup> bei kastrierten (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierten (sham, n=6 pro Zeitpunkt) Tieren nach 4, 8 und 12 Wochen, sowie bei kastrierten Tieren nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM; one-way ANOVA; \*  $p < 0,05$  vs. sham, #  $p < 0,05$  vs. 12-Wo-ORX.

Kastrierte Tiere hatten zu jedem Zeitpunkt höhere Strukturmodellindizes (SMI) als sham-kastrierte Versuchstiere, d.h. das trabekuläre Netzwerk der kastrierten Tiere war eher von einer stabähnlichen Struktur geprägt. Unter der Prämisse, dass die Kastration eine Osteoporose induziert, weist osteoporotischer Knochen folglich ein stabähnliches trabekuläres Netzwerk auf. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass Knochen mit zunehmendem Alter von einem plattenähnlichen in ein stabähnliches Netzwerk übergeht. Lauftraining konnte in allen 3 Modalitäten den SMI signifikant senken. Trainierte Tiere weisen demnach eine plattenförmigere Trabekelstruktur als untrainierte Tiere auf. In der uphill-Gruppe konnte der SMI um ca. 13%, in der level-Gruppe um ca. 16% und in der downhill-Gruppe um ca. 12% im Vergleich zu kastrierten, untrainierten Tieren gesenkt werden (Tabelle 3).

Auch bei der Konnektivitätsdichte (Conn.D) konnte der negative Einfluss des Testosteronmangels auf die Knochenstruktur durch die Kastration gezeigt werden. Kastrierte Tiere hatten zu jedem Zeitpunkt geringere Werte als die sham-kastrierten Kontrolltiere. Dies bedeutet, dass bei kastrierten Tieren eine deutliche geringere Anzahl von Unterbrechungen der trabekulären Verbindungen ausreicht, um eine Instabilität des gesamten Netzwerks zu bewirken, d.h. der trabekuläre Vernetzungsgrad bei kastrierten Tieren ist deutlich geringer und somit instabiler und anfälliger für Frakturierungen. Bei den Laufgruppen konnten nach dem level-Training 56% höhere Werte als bei den untrainierten, kastrierten Tieren beobachtet werden. Bei einem Mittelwert von 35,82 bei der level-Gruppe konnte annähernd der Kontrollwert der sham-kastrierten Tiere erreicht werden (Mittelwert 36,34). Uphill und downhill laufen hatte hier keinen signifikanten Einfluss auf die Regeneration in kastrierten Versuchstieren (Tabelle 3).

Die Kastration führte zu einem Abfall der trabekulären Knochenmineraldichte (BMD). Kastrierte Tiere hatten zu jedem Zeitpunkt eine signifikant geringere BMD als sham-kastrierte Kontrolltiere. Der positive Einfluss des Lauftrainings auf die Spongiosa spiegelte sich auch in der Knochenmineraldichte wider. Bei jeder der drei Trainingsformen kam es zu einem Anstieg der BMD im Vergleich zur 12-Wo-ORX-Gruppe. Bei der uphill-Gruppe konnten ca. 36%, bei der level-Gruppe ca. 46% und bei der downhill-Gruppe ca. 42% höhere Dichtewerte gemessen werden. Durch den regenerativen Einfluss des Lauftrainings konnten annähernd die Kontrollwerte der sham-kastrierten Tiere erreicht werden (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Quantitative Analyse der trabekulären Knochenmineraldichte (BMD, „bone mineral density“) in g/cm<sup>3</sup>. Dargestellt sind kastrierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierte Tiere (sham, n=6 pro Zeitpunkt) nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie kastrierte Tiere nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM; one-way ANOVA; \*  $p < 0,05$  vs. sham, #  $p < 0,05$  vs. 12-Wo-ORX.

### 4.3 3-Punkt-Biegemessung

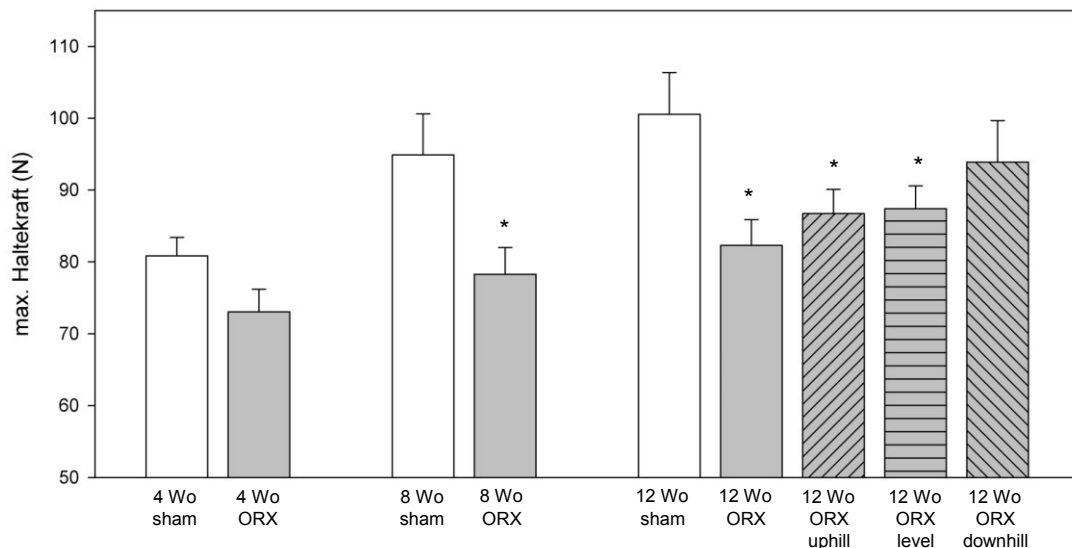
Verglichen wurden wie bei der  $\mu$ -CT-Analyse sham-kastrierte mit kastrierten Tieren nach 4, 8 und 12 Wochen, sowie die Tiere der drei Laufgruppen mit sham-kastrierten und untrainierten, kastrierten Tieren nach 12 Wochen.

#### 4.3.1 Maximale Haltekraft

Bei der Prüfung der maximalen Haltekraft, oder Bruchlast, zeigte sich erst nach 8 bzw. 12 Wochen eine signifikante Abnahme als Folge der Kastration. Nach 8 Wochen war bei der Kontrollgruppe eine um ca. 17 N höhere Kraft im Vergleich zu kastrierten Tieren nötig, um die Frakturierung des Knochens zu erreichen. Nach 12 Wochen war dieser Wert mit ca. 18 N nahezu gleich. Durch das Lauftraining konnte kein regenerativer Effekt im Sinne einer erhöhten Bruchlast nach Kastration erreicht werden. Die Werte der drei Laufgruppen waren etwas höher als bei der 12-Wo-ORX-Gruppe, aber statistisch nicht relevant. Die Bruchlast der 12-Wo-sham-Gruppe konnte folglich durch Training



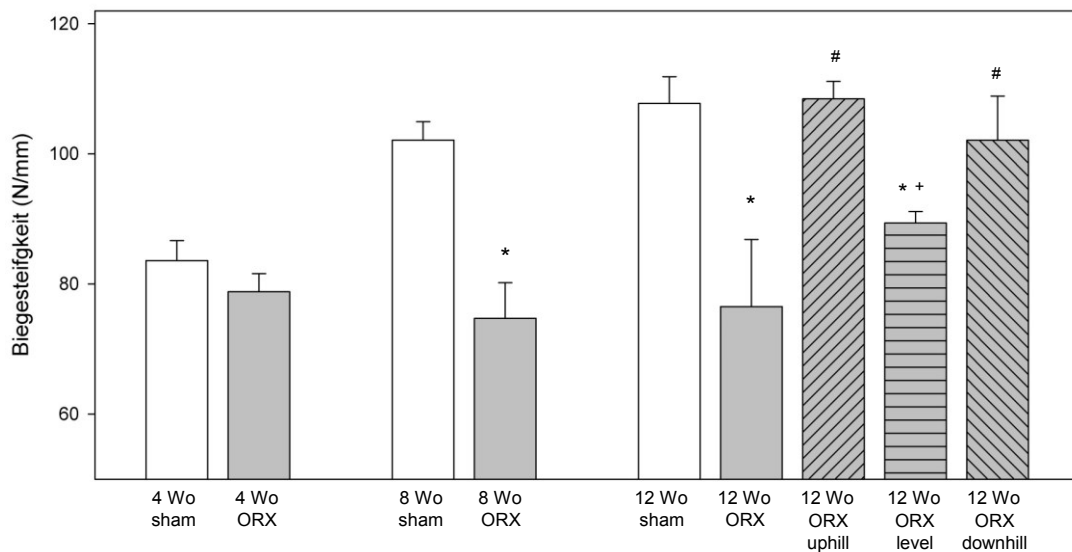
nicht erreicht werden. Mit einer um ca. 14 N bzw. ca. 13 N geringeren Haltekraft war die Bruchlast der uphill- und level-Gruppe sogar signifikant geringer als bei der sham-Gruppe (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Grafische Darstellung der maximalen Haltekraft in Newton (N). Dargestellt sind kastrierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierte Tiere (sham, n=6 pro Zeitpunkt) nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie kastrierte Tiere nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM; one-way ANOVA; \*  $p < 0,05$  vs. sham.

### 4.3.2 Biegesteifigkeit

Die Biegesteifigkeit nimmt durch die Kastration erst nach 8 und 12 Wochen deutlich ab. Nach 4 Wochen ist noch keine signifikante Minderung zu beobachten. Uphill Laufen bewirkte eine ca. 42-prozentige und downhill eine ca. 33-prozentige Steigerung nach Kastration. Im Gegensatz dazu hatte level-Training keinen signifikanten regenerativen Einfluss. Tiere aus der level-Gruppe zeigten sogar signifikant geringere Werte als Tiere aus der Kontroll- und uphill-Gruppe (Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Grafische Darstellung der Biegesteifigkeit in Newton pro mm (N/mm). Dargestellt sind kastrierte (ORX, n=6 pro Zeitpunkt) und sham-kastrierte Tiere (sham, n=6 pro Zeitpunkt) nach 4, 8 und 12 Wochen (Wo), sowie kastrierte Tiere nach 12 Wo, die uphill, level und downhill liefen. Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM; one-way ANOVA; \*  $p < 0,05$  vs. sham, #  $p < 0,05$  vs. 12-Wo-ORX, +  $p < 0,05$  vs. 12-Wo-ORX-uphill.

#### 4.4 Serum-Testosteronspiegel

Die Testosteronwerte im Serum lagen bei allen kastrierten Tieren unterhalb der ELISA Nachweisgrenze ( $< 0,2$  ng/ml). Bei sham-kastrierten Tieren zeigten sich zu allen drei Untersuchungszeitpunkten keine wesentlichen Unterschiede (4-Wo-sham:  $2,7 \pm 0,8$  ng/ml, 8-Wo-sham:  $2,4 \pm 0,9$  ng/ml, 12-Wo-sham:  $2,4 \pm 0,7$  ng/ml).

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 Diskussion von Material und Methode**

#### **5.1.1 Die Ratte als Versuchstier und Osteoporose Modell**

Ratten eignen sich speziell für die unfallchirurgische und orthopädische Forschung, da sie ein etabliertes Modelltier für Studien zur Knochenheilung, Knochendefekten, Arthrose und Osteoporose darstellen [Doll et al. 2001; Zhang et al. 2002]. Die Ratte ist aufgrund ihrer leichten Haltung sowie ihrer hohen Reproduktionsrate und schnellem Wachstum ein beliebtes Versuchstier, sodass Studien mit mehreren Gruppen und hoher Gruppengröße möglich sind. Außerdem besteht gegenüber Tierversuchen mit Ratten eine weitaus größere gesellschaftliche Akzeptanz als bei Verwendung größerer Tiere wie Hunde, Schweine oder Schafe.

Das am häufigsten verwendete Tiermodell der Osteoporoseforschung sind Nagetiere, wie etwa Ratten [Barlet et al. 1994]. Auch wenn Ratten die Geschlechtsreife mit etwa 2,5 Monaten erreichen, ist ihr Skelett erst ab ca. 10 Monaten voll ausgereift [Jee und Yao 2001]. Bei Tieren mit unreifem Skelett ist die maximale Knochenmasse noch nicht erreicht. Daher sind solche Versuchstiere ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Ernährungs-, Umwelt- und endokrinen Faktoren, die die maximale Knochenmasse beeinflussen können [Lelovas et al. 2008]. Tiere mit ausgereiftem Skelett hingegen sind ein geeignetes Modell für die postmenopausale oder die durch Immobilisation verursachte Osteoporose [Turner et al. 2001].

Des Weiteren sind Nagetiere unentbehrlich, wenn z.B. die Wirksamkeit und Toxizität eines neuen pharmakologischen Wirkstoffs bewertet werden soll, bevor eine etwaige Therapieoption bei einer anderen Spezies bestätigt wurde und in klinischen Studien am Menschen getestet werden kann [Aerssens et al. 1998].

Nachteile der Ratte sind ihre geringe Körpergröße, das geringe Blutvolumen und die hohe Stoffwechselrate [Rodgers et al. 1993]. Dadurch sind Untersuchungen mit orthopädischen Implantaten oder die mehrmalige Bestimmung von Serumparametern des Knochenstoffwechsels nicht möglich.

Neben Ratten existieren noch andere Spezies, die als Osteoporose Modell verwendet werden können. Größere Säugetiere wie Hunde mit gut entwickelten Ha-

vers-Kanälen sind für Untersuchungen des intrakortikalen Knochenumbaus geeigneter als Nagetiere, da diese kein Havers-System besitzen. Im Gegensatz dazu sind Hunde nur unzureichend als Modell für die postmenopausale Osteoporose geeignet, da die Ovariectomie bei ihnen nicht immer einen Knochenverlust hervorruft. Die mit der großen Größe und relativ langen Lebensdauer verbundenen Kosten bei der Haltung von Hunden machen sie als Tiermodell ebenfalls ungeeigneter als z.B. Nagetiere [Turner et al. 2001]. Affen wurden ebenfalls als Osteoporose Modell verwendet, da deren Physiologie mehr der des Menschen ähnelt als bei anderen Tieren. Nach experimenteller Immobilisierung kommt es bei den Tieren zwar zu einem deutlichen Knochenschwund, es zeigte sich jedoch kein wesentlicher Vorteil gegenüber anderen größeren Säugetieren wie Hunden [Young et al. 1986]. Zusätzlich wird der Gebrauch von Affen als Osteoporose Modell stark durch hohe Kosten, lange Lebensdauer, begrenzte Verfügbarkeit und ethische Gesichtspunkte limitiert.

### **5.1.2 Kastration als Tiermodell zur Induktion der Andropause**

Androgene entfalten ihre Wirkung v.a. durch Bindung an den Androgenrezeptor, der in den meisten Gewebetypen vorkommt. Da Androgene von dem Cytochrom P450-Aromatase-Komplex teilweise in Östrogene umgewandelt werden, können sie manche Wirkungen auch über den Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) entfalten [Vanderschueren et al. 2008]. Abu und Kollegen zeigten, dass der Androgenrezeptor auch von menschlichen Knochenzellen exprimiert wird, und zwar am meisten von Osteoblasten [Abu et al. 1997]. Eine Wechselwirkung von Androgenen mit dem Knochengewebe konnte experimentell bestätigt werden. So fand man in Versuchen mit Mäusen heraus, dass durch die Bindung von Androgenen an Androgenrezeptoren in Osteoblasten deren Aktivität stimuliert wird und somit zur Knochenbildung beiträgt [Chiang et al. 2009; Notini et al. 2007]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Osteoblasten Zielzellen für die Androgenrezeptor-vermittelte Aufrechterhaltung des Knochenvolumens sind. Obwohl der Androgenrezeptor neben Osteoblasten auch von Osteoklasten exprimiert wird, bleibt es nach wie vor unklar, ob und in welchem Umfang Androgenrezeptor-vermittelte Wirkungen in Osteoklasten für die knochenerhaltende Wirkung verantwortlich sind [Sinnesael et al. 2013]. Nichtsdestoweniger stellte sich heraus, dass Testosteron die Osteoklastenentwicklung aus deren hämatopoetischen Vorläuferzellen unterdrückt und somit einen inhibitorischen Effekt auf die Knochenresorption besitzt [Michael et al. 2005].

Die Ratte ist das am besten charakterisierte Tiermodell für die Wechselwirkung von Androgenen mit dem Skelett. Um diese Wechselwirkungen und die Auswirkungen auf den Knochenmetabolismus nach Wegfall der Sexualhormone zu evaluieren, wurden viele Verfahren bei männlichen und weiblichen Nagern angewandt, wie die chirurgische bzw. chemische Kastration, Verabreichung von Androgenrezeptor- bzw. Östrogenrezeptor-Antagonisten, Aromatase-Inhibitoren, SERMs, oder Typ II 5 $\alpha$ -Reduktase-Hemmer. Einige dieser Interventionen können jedoch auch zu extraskelletalen Manifestationen, wie z.B. Veränderungen der Körperzusammensetzung und Nahrungsaufnahme führen, was wiederum die Knochenhomöostase indirekt beeinflussen kann [Vanderschueren et al. 2004].

Die chirurgische Kastration stellt das am häufigsten verwendete Verfahren dar und wird bei weiblichen Tieren durch Ovariectomie und bei männlichen durch ORX herbeigeführt. In vorliegender Arbeit wurde als Verfahren die ORX gewählt. Sie führte mit Werten unterhalb der Nachweisgrenze von 0,2 ng/ml zu einer fast vollständigen Deprivation des Serum-Testosteronspiegels. Ein anderes Verfahren stellt die chemische Kastration dar. Sie kann durch Gonadotropin Releasing-Hormon (GnRH) Agonisten induziert werden und hat bei weiblichen Ratten ähnliche Auswirkungen auf das Skelett wie die chirurgische Kastration [Goulding und Gold 1993], der Einfluss auf den männlichen Rattenknochen wurde jedoch noch nicht hinreichend untersucht [Vanderschueren et al. 2004]. Kastration hat bei beiden Geschlechtern einen deutlichen Einfluss auf den trabekulären und kortikalen Knochen. Die Veränderungen der Spongiosa sind durch einen Anstieg des trabekulären Knochenumsatzes gekennzeichnet, der zu einem Knochenverlust bei kastrierten Ratten führt und zwar unabhängig von Geschlecht oder Alter [Gunnness und Orwoll 1995; Erben et al. 2000]. Diese Veränderungen in der Spongiosa sind mit der postmenopausalen Osteoporose vergleichbar [Turner et al. 1994]. Das erklärt, warum kastrierte weibliche und männliche Tiere als Modell für Osteoporose etabliert sind [Vanderschueren et al. 2004].

Auf zellulärer Ebene lässt sich eine Erhöhung der Osteoklastenzahl nach ORX beobachten. Die Osteoblastenzahl und -aktivität wird ebenfalls hochreguliert, um die Hohlräume, die durch die gesteigerte Knochenresorption durch die Osteoklasten entstehen, zu füllen [Gunnness und Orwoll 1995; Erben et al. 2000]. Trotz der gesteigerten Osteoblastenaktivität neigt die ORX-induzierte Knochenresorption dazu die Bildung zu übersteigen [Erben et al. 2000].

### 5.1.3 Übertragbarkeit vom Tiermodell auf den Menschen

In vorliegender Studie wurde der regenerative Einfluss von uphill, level und downhill Laufen auf die kortikale und trabekuläre Knochenstruktur im andropausalen Organismus der Ratte untersucht. Nun ist es unbestritten, dass der Mensch als Zweibeiner ein anderes Laufverhalten als die vierbeinige Ratte aufweist, da das quadrupedale Laufen der Ratte eine andere Beweglichkeit der Hüft- und Kniegelenke voraussetzt, als das bipedale Laufen des Menschen. Hosoido verglich in einer kürzlich publizierten Studie das Laufverhalten von Ratten und Menschen [Hosoido 2013]. Dabei wurde durch elektromyografische Untersuchungen belegt, dass die Muskeln der unteren Extremität, die bei der jeweiligen Stand- oder Schwungphase des Laufens kontrahieren, bei Mensch und Ratte gleich sind. Ähnliche Studien sind für weitere Vierbeiner durchgeführt worden. Elektrophysiologische Untersuchungen [Walmsley et al. 1978] und Simulationen des Gangbildes [Ekeberg und Pearson 2005] von Katzen belegten, dass die Muskelgruppen der unteren Extremität, welche für den Stand- Schwungphasenübergang verantwortlich sind, bei Mensch und Katze gleich sind [Capaday 2002]. Auch bei anderen Krankheiten finden sich positive Effekte von Training bei Mensch und Tier, so z.B. bei neuromuskulären Krankheiten [Fowler, William M Jr 2002] oder im Rahmen von Untersuchungen der kognitiven Fähigkeiten [Hillman et al. 2008]. Folglich wurde bei vorliegender Arbeit davon ausgegangen, dass durch das Lauftraining bei Ratten die gleichen Muskelgruppen wie beim Menschen beansprucht werden und dadurch ein ähnlicher Reiz am Knochen ausgeübt wird und dass eine Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Tier auf den Menschen grundsätzlich vorliegt.

Nagetierknochen reagieren auf Osteoporose-auslösende Faktoren ähnlich wie der menschliche Organismus. So zeigt beispielsweise die ovariektomierte Ratte die meisten der pathophysiologischen Mechanismen, die auch bei der postmenopausalen Osteoporose vorkommen. Eine Verschmälerung der Kortikalis und reduzierte mechanische Eigenschaften des Knochens sind bei alternden Ratten und Mäusen gut dokumentiert und auf Immobilisation reagiert der Rattenknochen mit einer Zunahme der kortikalen Porosität [Turner 2001].

Ein Unterschied zwischen dem menschlichen Skelett und dem der Ratten ist, dass sich die Wachstumsfuge bei Ratten nie vollständig schließt. Dadurch behalten einige Knochen lebenslang ihre Fähigkeit zum Längenwachstum [Vanderschueren et al. 2004]. Tomographische oder histomorphologische Messungen sollten daher 1 mm

distal der Wachstumsfuge erfolgen, um Messungen des physiologischen Knochenwachstums zu vermeiden [Lelovas et al. 2008].

Weiterhin muss beachtet werden, dass bei Nagern keine Spontanfrakturen auftreten [Vanderschueren et al. 2004], welche ein Hauptmerkmal von Osteoporose bei Menschen darstellen. Unter Berücksichtigung der WHO-Definition, die nur den gemessenen Knochendichtewert und nicht Spontanfrakturen beinhaltet, können Ratten jedoch als ein geeignetes Modell für Osteoporose erachtet werden [Lelovas et al. 2008].

#### **5.1.4 Zeitpunkte der Untersuchung nach Kastration**

Im vorgestellten experimentellen Setup wurden drei Zeitpunkte ausgesucht, um eine Kinetik der untersuchten Parameter nach Kastration zu beschreiben. Weiteres Ziel des experimentellen Aufbaus war es, die biologischen Vorgänge nach Kastration und Lauftraining darzustellen und diese mit einer sham-Kastration zu vergleichen.

Bereits wenige Stunden nach der Kastration sinkt bei Ratten der Testosteronspiegel auf ein Zehntel und bleibt lebenslänglich auf diesem reduzierten Niveau [Mazwell 1978]. Eine Osteoporose ist bei männlichen Ratten schon zwei Monate nach Kastration durch Reduktion der Knochendichte erkennbar [Wink und Felts 1980]. Biochemisch lassen sich schon ab dem 28. Tag nach der Kastration erhöhte Spiegel des Knochenabbaumarkers Deoxypyridinolin im Urin nachweisen [Borst und Conover 2006].

Nach Zusammenschau der Literatur ist daher davon auszugehen, dass 12 Wochen nach Kastration ausreichend sind, um einen biologischen Effekt im Sinne der Osteoporose nachweisen zu können. Als Untersuchungszeitpunkte wurden 4, 8 und 12 Wochen nach Kastration gewählt, um die Kinetik der kortikalen und trabekulären Veränderungen zu beobachten.

#### **5.1.5 Einfluss von Training auf das muskuloskelettale System**

Knochengewebe reagiert auf eine Vielzahl von internen und externen Stimuli. Die größte Auswirkung auf die Knochengesundheit stellen unveränderliche, intrinsische Fakto-

ren, wie Geschlecht, Rasse und die Familienanamnese dar. Aber auch modifizierbare äußere Einflüsse, wie die individuelle Lebensweise, können zu Änderungen der Knochenstruktur führen [DiVasta und Gordon 2013]. So ist schon lange bekannt, dass körperliche Aktivität grundsätzlich einen positiven Effekt auf das muskuloskelettale System hat. Dabei spielt die durch Bewegung entstehende mechanische Belastung und Verformung eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Knochens [Turner 1998]. Um diesen externen Stimulus erfolgreich umzusetzen, ist Knochengewebe mit einem mechanosensorischen System ausgestattet, das die Anpassung auf mechanische Belastung ermöglicht. Der Knochen nimmt damit zunächst die durch die Belastung induzierte Verformung wahr und löst dann eine entsprechende Antwort aus. Diese führt zu einer Erhöhung der Knochenneubildungsrate, um sich an die erhöhten Belastungen anzupassen [Leppanen et al. 2008]. Regelmäßiges physisches Training während der Knochengewebereifung trägt so zu einer erhöhten maximalen Knochen-dichte und -masse bei. Diese günstigen Auswirkungen auf den Knochen wurden besonders bei gewichtsbelastenden Betätigungen, wie etwa Laufen, belegt und haben sich als langfristig wirksam gezeigt [Nordstrom et al. 2006]. Körperliches Training wird daher zur Prävention von primärer Osteoporose empfohlen [Sinaki et al. 2010].

Das heranwachsende Skelett in jungen Jahren besitzt die größte Anpassungsfähigkeit. Daher können Maßnahmen, die in diesen Zeitraum fallen, am ehesten Veränderungen am Knochen hervorrufen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die frühe Pubertät der günstigste Zeitpunkt ist, um den positiven Effekt von körperlicher Bewegung auf die Knochenentwicklung zu beobachten [Kontulainen et al. 2002; Wang et al. 2005]. Regelmäßige körperliche Betätigung bereits in der Kindheit und Adoleszenz erhöht die Knochenmasse, was wahrscheinlich das Risiko zur Entstehung von Osteoporose im Erwachsenenalter verringert [Kannus 1999]. Dabei ist jedoch zu beachten, dass zu intensives Training in der Wachstumsphase die Knochenmineraldichte verringern kann [Barry und Kohrt 2008].

Zusätzlich werden die Knocheneigenschaften auch durch die Muskelmasse beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass die Zugkräfte des Muskels auf den Knochen während der Kontraktion einen entscheidenden positiven Einfluss auf die morphologischen und mechanischen Eigenschaften des Knochens haben [Burr 1997].

Im Gegensatz zu körperlichem Training führt anhaltende Immobilisation zu Knochenschwund, da die mechanischen Stimuli auf den Knochen dadurch stark abnehmen. Strikte Bettruhe führt zu einem Knochenverlust von ca. 1%-2% pro Monat [Heer et al. 2005]. Sowohl eine Abnahme der Knochenneubildung als auch ein simul-



taner Anstieg der Knochenresorption liegen diesem Verlust an Knochenmasse zugrunde [Bikle und Halloran 1999]. Bereits am zweiten Tag der Immobilisation ist ein deutlicher Anstieg der Knochenresorptionsmarker nachweisbar [Heer et al. 2005]. Die erhöhte Osteoklastenaktivität erreicht nach drei bis fünf Tagen ein Maximum und ist wahrscheinlich der Hauptgrund für den Verlust von spongiösem Knochen während der Immobilisation [DiVasta und Gordon 2013].

In vorliegender Studie ging es primär um die Frage, wie unter verschiedenen Trainings-Stimuli die Knochenregeneration vorangetrieben wird. Hierbei stellen die drei Laufmodalitäten uphill, level und downhill unterschiedliche Reize sowohl für den Knochen, als auch für den Muskel dar. Beim downhill Laufen werden überwiegend exzentrische Muskelkontraktionen durchgeführt [Armstrong et al. 1983]. Diese Kontraktionsform erzeugt einen kontinuierlichen mechanischen Stimulus am Knochen, welcher wiederum einen Anstieg der Knochenmasse bewirkt [Hamann et al. 2012]. Kontinuierliche exzentrische Kontraktionen erzeugen ein Muskeltrauma durch Destruktion der Muskelfaser [Schwane und Armstrong 1983], was sich wiederum negativ auf den Knochenaufbau auswirken kann. Uphill-Training führt durch konzentrische Muskelkontraktionen überwiegend zu einem Aufbau der Muskelmasse, einem Anstieg der Zugkräfte an den myotendinösen Verbindungen und somit zu einem Anstieg der Knochendichte [Wu et al. 2001]. Ein Muskeltrauma beim uphill-Training wird hingegen nicht beschrieben [Lynn und Morgan 1994; Lynn et al. 1998]. Level Training stellt eine Trainingsform dar, welche von den Auswirkungen auf das muskuloskelettale System zwischen uphill- und downhill-Training angesiedelt werden muss.

Das Trainingsprotokoll beinhaltete ein Intervalltraining, da sich dieses mit seinen kurzzeitigen Leistungsspitzen als osteoprotektiv gezeigt hat [Boudenot et al. 2012; Chen et al. 2004] und das Laufband für uphill und downhill jeweils mit einer Neigung von 10° eingestellt. Kaastad und Kollegen verwendeten ein ähnliches Setting. Sie ließen ovariectomierte Ratten 8 Wochen mit 27 m/min bei einer Neigung von 10° laufen [Kaastad et al. 1996]. Die Steigung und das Gefälle des Laufbands mit jeweils 10° kann im Vergleich zu zwei anderen Arbeiten, in denen jeweils 16° gewählt wurde, als moderat angesehen werden [Armstrong et al. 1983; Butterfield et al. 2005].

## 5.1.6 Diskussion der Untersuchungstechniken

### 5.1.6.1 $\mu$ -CT

Mit Hilfe der  $\mu$ -CT ist es möglich, dreidimensionale Datensätze zu erzeugen, welche die natürliche Struktur des Knochens adäquater abbilden als zweidimensionale Messverfahren wie die Histomorphometrie. Bis vor kurzem war die Auswertung von histologischen Schnitten des Knochens die Standardmethode, um die trabekuläre und kortikale Knochenarchitektur zu beurteilen. Wenngleich histologische Analysen detaillierte Informationen über die Zellaktivität und den daraus resultierenden Knochenumbau liefern, haben sie Einschränkungen bei der Beurteilung der Knochenmikroarchitektur. Dies liegt daran, dass zur Extrapolation der in den zweidimensionalen Schnitten gewonnenen Ergebnisse in die dritte Dimension Modellannahmen über die zugrundeliegende Architektur gemacht werden, die im allgemeinen nicht erfüllt sind. Im Gegensatz dazu können dreidimensionale bildgebende Verfahren wie  $\mu$ -CT die Knochenmikroarchitektur direkt messen, ohne sich auf bestimmte Modellannahmen zu beziehen [Bouxsein et al. 2010].

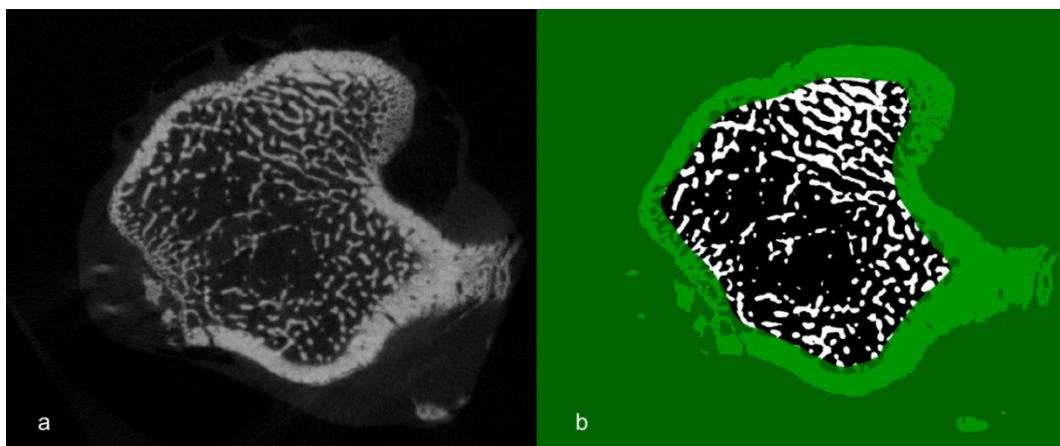
Mit momentan erhältlichen  $\mu$ -CT Scannern kann eine isotrope Voxelgröße von wenigen  $\mu\text{m}$  erreicht werden. Bei den in vorliegender Studie erstellten Aufnahmen betrug die Voxelgröße 9  $\mu\text{m}$ . Solche Auflösungen sind ausreichend, um beispielsweise Maustrabekel zu analysieren, die eine Dicke von etwa 20 bis 30  $\mu\text{m}$  haben [Martin-Badosa et al. 2003].

Um eine Einordnung und Standardisierung der Ergebnisse und Anwendung der  $\mu$ -CT zu erreichen, wurden in einigen Studien die Ergebnisse mit Resultaten konventioneller histomorphometrischer Methoden verglichen [Müller et al. 1998; Chappard et al. 2005; Bonnet et al. 2009]. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die 2D- und 3D-Analysen der  $\mu$ -CT in der Regel stark mit der zweidimensionalen Histomorphometrie korrelieren.

Die  $\mu$ -CT bietet zahlreiche Vorteile bei der Bestimmung von Knochenmasse und -morphologie. Anders als bei der histologischen Auswertung, bei der trabekuläre Parameter mithilfe von zweidimensionalen Modellen abgeleitet werden müssen, sind bei der  $\mu$ -CT direkte 3D Messungen der trabekulären Struktur möglich [Hildebrand und Rüegsegger 1997]. Es können größere Volumina analysiert werden und die Messungen bzw. Auswertungen sind um einiges schneller als bei der Histomorphometrie. Ein

weiterer Vorteil ist, dass die Proben nicht zerstört und entkalkt werden müssen und somit für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen [Bouxsein et al. 2010].

Trotz der vielen Vorteile weist die  $\mu$ -CT auch Schwächen auf. Sie liefert keine Informationen über den Knochenumsatz, also die zelluläre Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten [Müller et al. 1998]. Außerdem lassen sich die Ergebnisse verschiedener Autoren nicht ohne Weiteres vergleichen, da verschiedene  $\mu$ -CT Systeme zur Verfügung stehen, die unterschiedliche Algorithmen zur Berechnung der Parameter verwenden [Chappard et al. 2005]. Des Weiteren ist die genaue Darstellung von so feinen Strukturen, wie es die Spongiosa darstellt, stark von der Auflösung abhängig. Nur Auflösungen unter 50  $\mu$ m liefern Ergebnisse, die mit der Histomorphometrie vergleichbar sind [Mitton et al. 1998]. Ein weiteres Problem stellt die Einstellung des Schwellenwertes (threshold) dar. Dieser Vorgang transformiert das Rohbild in ein Binärbild mit schwarz und weiß als Helligkeits-Abstufungen (Abbildung 21). Nur die als weiß gekennzeichneten Teile innerhalb des Bildes dienen als Grundlage für die Berechnungen.



**Abbildung 21:** Für die Analyse wird das Rohbild (a) in ein Binärbild (b) umgewandelt. Nur die weißen Strukturen innerhalb der ROI werden für die Analyse miteinbezogen.

Dabei kann die Helligkeits-Abstufung frei gewählt werden, indem ein Bereich mit einem oberen und unteren Grenzwert definiert wird. Alle Teile des Knochens, die innerhalb dieses Bereiches als hell erscheinen, werden im Binärbild als weiß dargestellt und die Bereiche außerhalb der Auswahl sind schwarz. Die Ergebnisse der  $\mu$ -CT Analyse sind also maßgeblich von der Einstellung des Schwellenwertes abhängig. Von Rüegsegger und Kollegen konnte bei einer Auflösung von 14  $\mu$ m ein linearer Zusammenhang zwischen dem relativen Knochenvolumen (BV/TV) und der Höhe des Schwellenwertes gezeigt werden. Eine Veränderung des Schwellenwertes um 10% verursachte eine

Veränderung des relativen Knochenvolumens um 5% [Rüegsegger et al. 1996]. Man unterscheidet zwischen einem globalen und lokalen Schwellenwertverfahren. Beim globalen Ansatz wird ein Schwellenwert für das gesamte Bild festgelegt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass es Helligkeitsschwankungen innerhalb des Bildes nicht berücksichtigt und kann daher nur für kontrastreiche Aufnahmen eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu basiert das lokale Verfahren auf Graustufenschwankungen innerhalb der Aufnahme. Es berücksichtigt die unterschiedlichen Röntgenabschwächungen durch das inhomogene Material der Probe, wodurch die Grenzen der unterschiedlichen Strukturen innerhalb der gescannten Probe besser dargestellt werden können [Cooper et al. 2004]. Die Wahl des Schwellenwertverfahrens wird kontrovers diskutiert. Einige Autoren [Rüegsegger et al. 1996; Müller et al. 1998] bevorzugen aufgrund des hohen Knochen/Mark-Kontrastes und um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen das globale Verfahren. Außerdem argumentieren sie, dass durch die unterschiedliche Wahl des Schwellenwertes für einzelne Regionen falsch positive Ergebnisse zu erwarten sind. Andere Autoren wie Cooper und Kollegen [Cooper et al. 2004] sprechen sich für ein lokales Verfahren aus, da hierdurch die Inhomogenität des Materials und die daraus resultierenden unterschiedlichen Röntgenabschwächungen adäquater berücksichtigt werden. Aufgrund des hohen Kontrastes des Knochens zum umgebendem Gewebe und um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen, wurde in vorliegender Arbeit ein globaler Schwellenwertbereich von 65–255 für den trabekulären und 100–255 für den kortikalen Knochen gewählt.

#### **5.1.6.2 3-Punkt-Biegemessung**

Die mechanischen Eigenschaften des Knochens setzen sich aus mehreren Teilqualitäten zusammen. Die Zug-, Biege-, und Torsionsfestigkeit wird überwiegend von der Kortikalis determiniert. Die Kraftweiterleitung und -verteilung ist v.a. eine Eigenschaft der Spongiosa und wird durch Kompression ausgelöst [Athanasίου et al. 2000].

Der Biegeversuch ist eine gängige Methode, um die mechanischen Eigenschaften von Nagetierknochen oder anderer Kleintiere zu messen. Dabei wird der ganze Knochen bis zum Bruch belastet. Die Durchbiegung verursacht auf der einen Seite des Knochens eine Zugspannung und auf der gegenüberliegenden Seite eine Druckspannung, wobei die Zugfestigkeit des Knochens erheblich geringer als seine Druckfestigkeit ist [Turner und Burr 1993]. Infolgedessen ist die Biegebeanspruchung für den Kno-

chen am gefährlichsten. Wie bereits erwähnt, bewertet der Biegeversuch v.a. die biomechanischen Eigenschaften des kortikalen Knochens.

Der Biegeversuch kann entweder als 3-Punkt oder 4-Punkt-Biegeversuch durchgeführt werden. Bei dem in dieser Studie verwendeten 3-Punkt-Biegetest wird der Probekörper auf zwei Auflagen positioniert und in der Mitte mit einer Druckplatte (Prüfstempel) belastet. Dies ist wahrscheinlich die am häufigsten verwendete Form des Biegeversuchs und erlaubt die maximale Haltekraft bzw. Biegesteifigkeit anhand des Kraft-Weg-Diagramms zu ermitteln. Beim 4-Punkt-Biegetest besteht der Prüfstempel aus zwei Druckplatten. Bei beiden Versuchen muss die Spannweite, also der Abstand zwischen den beiden Auflageflächen, ausreichend sein, um eine akkurate Durchführung der Messung zu gewährleisten. Ist diese zu klein, wird ein Großteil der durch die Belastung induzierten Verformung durch Scherkräfte verursacht und nicht durch die Biegung an sich. Grundsätzlich sollte die Spannweite das 16-fache der Probendicke betragen [Turner und Burr 1993]. Bei Biegeversuchen mit Knochen kann dieses Verhältnis jedoch nicht erreicht werden.

Der Vorteil der 3-Punkt-Biegemessung liegt in seiner einfacheren Ausführung, führt aber zu hohen Scherkräften in der Mitte des Schaftes, wo der Prüfstempel auf den Knochen trifft. Bei der 4-Punkt-Biegung wird die Kraft auf eine größere Fläche verteilt, was biomechanisch im Vergleich zur 3-Punkt-Biegung günstiger ist [Burstein und Frankel 1971]. Zudem ist beim 4-Punkt-Versuch gewährleistet, dass zwischen den beiden Druckplatten des Prüfstempels nur Biegekräfte und keine Scherkräfte entstehen. Dies setzt allerdings voraus, dass die durch die beiden Druckplatten einwirkenden Kräfte auf den Knochen gleich sind. Bei regelmäßig geformten Proben wie beispielsweise einem Zylinder wird diese Voraussetzung erfüllt, nicht jedoch bei Knochen. Hinzu kommt, dass die Tibia in ihrem Verlauf einen unregelmäßigen, dreieckigen Querschnitt aufweist und somit standardisierte biomechanische Testungen erschwert sind [Cheung et al. 2003]. Daher wird der 3-Punkt-Biegeversuch häufiger zur Messung der mechanischen Eigenschaften von Nagetierknochen verwendet [Turner und Burr 1993]. Außerdem waren die in vorliegender Studie analysierten Tibiae zu klein um eine 4-Punkt-Biegemessung durchzuführen, da bei Belastung mit 2 Druckplatten nicht genügend Abstand zu den äußeren Auflagen besteht.

Neben dem Biegeversuch existieren noch weitere Verfahren, um die biomechanischen Eigenschaften des Knochens zu untersuchen:

- Zugversuch: Hier werden standardisierte Proben in Würfel- oder Zylinderform mit definierter Querschnittsfläche bis zum Bruch gedehnt. Der Zugversuch kann eine

der exaktesten Methoden sein, um die Knocheneigenschaften zu messen, da hier kein zusätzliches Biegemoment auf den Knochen einwirkt, wie etwa beim Biegeversuch. Er ist daher weit verbreitet, um die Versagenslast zu bestimmen. Von Nachteil ist, dass die Proben relativ groß und sorgfältig bearbeitet sein müssen, da sie möglichst genau entlang der Zugachse ausgerichtet werden sollen. Daher ist es schwierig ganze Knochen zu testen, da diese eine unregelmäßige Form haben. Eine ausreichende Probengröße ist besonders bei der Untersuchung der Spongiosa notwendig, da für eine genaue Messung das trabekuläre Netzwerk möglichst nicht unterbrochen werden soll [Turner und Burr 1993].

- Kompressionsversuch: Er ist eine beliebte Methode, um v.a. die mechanischen Eigenschaften des trabekulären Knochens zu untersuchen, weil es die Belastung der Spongiosa am besten simuliert. Auch hier werden wie beim Zugversuch die Proben in Würfel- oder Zylinderform zurechtgeschnitten. Ein Vorteil ist, dass nur relativ kleine Proben benötigt werden. Von Nachteil ist, dass die Enden der Proben gleichmäßig belastet werden müssen. Falls die Probe leicht verkippt ist, ist die Krafteinwirkung an den Rändern größer als im Zentrum. Belastbare Ergebnisse sind dadurch schwerer zu erreichen als im Zugversuch [Athanasiou et al. 2000]. Die Probenpräparation an sich ist ein weiterer Nachteil. Durch das Zurechtschneiden der Proben wird das trabekuläre Netzwerk unterbrochen, was bei der Messung zu falsch negativen Werten führen kann [Odgaard und Linde 1991]
- Torsionsversuch: Der Torsionstest kann verwendet werden, um die mechanischen Eigenschaften bei Einwirkung von Scherkräften zu untersuchen. Dabei werden die Knochenenden in Kunstharzblöcke fixiert und die Blöcke relativ zueinander verdreht [Turner und Burr 1993]. Die größte Schwäche dieses Tests liegt in der Notwendigkeit, bei der Berechnung der Messwerte Annahmen über die Knochengeometrie der Probe aufzustellen. Daher wird der Diaphysenquerschnitt im Allgemeinen als Kreis oder Ellipse vereinfacht dargestellt. Die tatsächliche Form ist jedoch komplexer und variiert im Verlauf der Diaphyse. Dadurch können erhebliche Messungenauigkeiten auftreten, wenn man Knochen mit unterschiedlichen Formen und Größen miteinander vergleicht [Beaupied et al. 2007].

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Ossäre Veränderungen nach ORX

In der hier vorgestellten Arbeit konnte eine Verschlechterung der untersuchten Knochenparameter im Sinne einer Osteoporose nach ORX nachgewiesen werden. Analog dazu konnte Monteagudo und Kollegen zeigen, dass die Knochendichte bei ovariectomierten Ratten bereits nach 4 Wochen deutlich abnimmt [Monteagudo et al. 1997]. Es bestanden jedoch Unterschiede hinsichtlich der Veränderungen im kortikalen und trabekulären Knochen. Die Effekte der Kastration waren anhand der  $\mu$ -CT Ergebnisse in der Spongiosa deutlich ausgeprägter als in der Kortikalis. So konnten bei den Parametern B.Ar/T.Ar, cortical Tb.Th und cortical BMD kein Abfall zu allen drei Zeitpunkten postoperativ festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit einer früheren Studie, in der Ovariectomie bei Wistar Ratten die BMD der Spongiosa, nicht jedoch der Kortikalis signifikant verringerte [Tamaki et al. 1998].

Im Gegensatz zum menschlichen Skelett besitzt die Kortikalis von Nagetieren keine Havers-Kanäle. Aus diesem Grund ist der kortikale Knochenverlust nach ORX nicht so offensichtlich [Vanderschueren et al. 2004]. Zudem erfolgt der Knochenverlust bei Osteoporose in der Spongiosa schneller, da dort die Knochenumbaurate höher ist [Wu et al. 2008]. Dies könnten mögliche Erklärungen dafür sein, warum es in vorliegender Arbeit nach Kastration zu keiner signifikanten Veränderung der kortikalen Flächenfraktion, kortikalen Schichtdicke und kortikalen Knochenmineraldichte kam.

Reim und Kollegen konnten hingegen mittels peripherer quantitativer CT und Histomorphometrie bei Fischer-344 Ratten eine Abnahme von B.Ar/T.Ar, cortical Tb.Th und cortical BMD nach ORX zeigen [Reim et al. 2008]. Dies könnte durch die verschiedenen Untersuchungsmethoden oder den anderen Rattenstamm begründet sein.

Im Gegensatz zur Kortikalis kam es in vorliegender Studie nach allen drei Untersuchungszeitpunkten zu einem Spongiosaverlust. Dies zeigte sich an der Erniedrigung von BV/TV, einem Rückgang der Tb.N und umgekehrt zu einem Anstieg der Tb.Sp. Außerdem nahm neben der BMD die Vernetzung des trabekulären Geflechts (Conn.D) ab und es kam zu einem Umbau der Spongiosa von einer plattenförmigen in eine stabförmige Struktur, was durch den ansteigenden SMI ausgedrückt wird. Lediglich die Dicke der Trabekel und der Anisotropiegrad veränderten sich postoperativ nicht.

In einer ähnlichen Arbeit von Erben und Mitarbeiter wurde u.a. die Tb.N und Tb.Th von Rattentibiae histomorphologisch bei kastrierten Tieren untersucht. Sie wie-

sen ebenfalls eine Reduzierung der Tb.N ohne gleichzeitige Abnahme der Tb.Th im Vergleich zu sham-Kontrolltieren nach [Erben et al. 2000]. Bei der postklimakterischen Osteoporose wird angenommen, dass die Reduzierung der Tb.N durch übermäßige Osteoklastenaktivität ausgelöst wird, die zu einer Perforation der einzelnen Trabekel führt und dies wiederum zu einem vollständigen Abbau der Trabekel [Parfitt 1984]. Daraus folgt eine Reduzierung der Anzahl und nicht eine Ausdünnung der Trabekel.

Auch wenn die kastrierte Ratte ein anerkanntes Osteoporosemodell darstellt, sind die molekularen pathogenetischen Mechanismen nach wie vor unzureichend geklärt. Als potentieller Mediator für den Knochenverlust durch Sexualhormonmangel wurde das Osteoprotegrin (OPG)/RANKL System diskutiert. RANKL stimuliert die Osteoklastenreifung und damit die Knochenresorption [Suda et al. 1999] und OPG stellt den natürlich vorkommenden Inhibitor von RANKL dar [Simonet et al. 1997]. Die Ratio aus OPG und RANKL ist ein bestimmender Faktor für die Knochenresorption und Sexualhormone regulieren die Expression von OPG und RANKL in vitro [Hofbauer und Schoppet 2004]. Die Kastration männlicher Ratten bewirkt eine Erhöhung der RANKL mRNA Expression im Knochen [Franklin et al. 2006] und somit den Knochenabbau. Umgekehrt verringert Östradiol die OPG/RANKL mRNA Ratio und erhöht die trabekuläre Knochenmineraldichte von männlichen kastrierten Mäusen [Lindberg et al. 2001]. RANKL wird im Knochenmark von Stromazellen, aktivierten T-Lymphozyten und B-Lymphozyten synthetisiert [Kong et al. 1999]. Die zelluläre Quelle der erhöhten RANKL Konzentration im Knochengewebe von kastrierten Ratten bleibt dennoch unklar. Ergebnisse von Mausexperimenten legen nahe, dass T-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Effekte auf den Knochenumsatz bei Sexualhormonmangel spielen [Roggia et al. 2001]. Zusätzlich konnte von Erben und Kollegen gezeigt werden, dass die B-Lymphopoese bei alternden Ratten hochreguliert wird [Erben et al. 2001]. Von T- und B-Lymphozyten synthetisiertes RANKL scheint daher bei der Pathogenese von ORX-induziertem Knochenverlust beteiligt zu sein. Andererseits führt ein Androgenmangel bei Männern eher zu einer gesteigerten RANKL-Expression in Osteoblasten, aber nicht zu einer Hochregulierung der RANKL-Expression in T- oder B-Lymphozyten [Sanyal et al. 2008].

Die mechanische Festigkeit eines Knochens ist wahrscheinlich die wichtigste Kenngröße zur Beurteilung des Frakturrisikos. Osteoporotische Veränderungen setzen diese herab und prädisponieren zu Spontanfrakturen. Auch wenn eine in der Ratte experimentell induzierte Osteoporose nicht zu Frakturen führt, ist es dennoch ein nützliches Modell, um die frühen Ereignisse der Osteoporose zu untersuchen [Kalu 1991].



Um die biomechanischen Eigenschaften zu evaluieren, wurde in vorliegender Arbeit ein 3-Punkt-Biegeversuch mit der Tibia durchgeführt. Sowohl die maximale Haltekraft, als auch die Biegesteifigkeit reduzierten sich 8 bzw. 12 Wochen nach ORX. Diese Ergebnisse decken sich mit vorhergehenden Studien, in denen im 3-Punkt-Biegeversuch ebenfalls eine Verschlechterung der biomechanischen Eigenschaften bei Femora von orchiectomierten Ratten festgestellt wurde [Gradosova et al. 2012; De La Piedra, Concepcion et al. 2011; Broulik et al. 2007].

Wie bereits oben erwähnt, wird die Biegefestigkeit des Knochens überwiegend von der Kortikalis determiniert. Interessanterweise decken sich die Ergebnisse des Biegeversuchs nicht vollständig mit der  $\mu$ -CT Analyse der Kortikalis, bei der B.Ar/T.Ar, die kortikale Schichtdicke und BMD nach ORX nicht abnahmen. Lediglich T.Ar und B.Ar zeigten die gleiche Kinetik wie der Biegeversuch und reduzierten sich signifikant nach 8 und 12 Wochen. Dabei ist zu beachten, dass die  $\mu$ -CT-Analyse Werte liefert, die die Knochenqualität nur indirekt beschreiben. Durch sie können die strukturellen Eigenschaften beschrieben werden, aber nicht die Knochenfestigkeit an sich. Die Knochenfestigkeit hängt nicht nur von dem Grad der Mineralisierung ab, sondern auch von der Anordnung und mikroskopischen Struktur der einzelnen Knochenbestandteile. Eine verminderte Knochenfestigkeit kann also die Folge von einer veränderten räumlichen Anordnung von Trabekeln sein, ohne dass dabei die Masse oder die Mineraldichte des Knochens abnimmt [Broulik et al. 2005]. Biomechanische Untersuchungen sind daher wichtig, um die funktionelle Aussagekraft von strukturellen Veränderungen des Knochens zu beurteilen [Burr et al. 1997]. Bonel und Kollegen korrelierten densitometrische bzw. geometrische Parameter der Kortikalis der distalen Radiusmetaphyse von Menschen mit den Ergebnissen aus mechanischen Untersuchungen. Sie postulierten, dass die mittels DXA und Mehrschicht-CT ermittelten Parameter die Vorhersage der mechanischen Bruchfestigkeit nur geringfügig verbessern können [Bonel et al. 2004]. Der Biegeversuch ist daher wohl aussagekräftiger als die  $\mu$ -CT, um die Festigkeit des Knochens und somit das Frakturrisiko zu beurteilen, da diese v.a. Aussagen über die Knochengeometrie erlaubt.

### 5.2.2 Strukturelle und funktionelle Auswirkungen der drei Laufmodalitäten

Das vorrangige Ziel vorliegender Studie war es herauszufinden, ob die unterschiedlichen Trainingsstimuli von uphill, level und downhill Laufen mit ihren verschiedenen Muskelkontraktionsformen bzw. mechanischen Beanspruchungsmustern einen jeweils anderen regenerativen Effekt auf die Tibia im Rattenmodell ausüben. Nach Zusammenschau der Literatur gibt es bislang keine Studien, die den regenerativen Effekt auf den Knochen der drei Laufmodi im andropausalen Organismus verglichen haben.

Im Allgemeinen waren die Veränderungen durch das Laufbandtraining an der Spongiosa ausgeprägter als an der Kortikalis. Diese Beobachtung deckt sich auch mit einer Arbeit von Fritton und Kollegen, die eine weniger ausgeprägte Adaption der Kortikalis auf mechanische Belastung postulierten, da die Spongiosa metabolisch aktiver ist und eher auf Belastungsänderungen reagiert [Fritton et al. 2005].

Ähnliche Studien mit Ratten, in denen der Effekt von Laufbandtraining auf den Knochen untersucht wurde, kamen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Einige Arbeiten zeigten keine Veränderung oder sogar eine Abnahme der Knochenmasse und -festigkeit [Bourrin et al. 1994; Hou et al. 1990], andere eine Zunahme [Huang et al. 2008; Mosekilde et al. 1994; Raab et al. 1990]. Diese Diskrepanz bei den Ergebnissen könnte auf Unterschiede im Alter der Ratten, der analysierten Knochenregion oder der Dauer bzw. Art des Trainings begründet sein. Das Intervalltraining in vorliegender Arbeit stellte eine hohe körperliche Belastung für die Versuchstiere dar und zeigte bei allen drei Laufmodalitäten wesentliche regenerative Effekte auf die untersuchten Tibiae. Im Gegensatz dazu konnte Ip und Kollegen in einer anderen Studie mit adipösen Ratten zeigen, dass moderates Laufbandtraining (50 min/d bei einer Geschwindigkeit von 20 m/min und 0° Steigung) zwar geeignet ist, das Körpergewicht zu senken, jedoch nicht um den Knochenverlust abzumildern, der bei den übergewichtigen Tieren im Vergleich zu normalgewichtigen Tieren auftrat. Sie schlugen daher ein intensiveres Training vor, um die Knochenstruktur zu beeinflussen [Ip et al. 2009]. Joo und Kollegen ließen männliche Wistar Ratten mit einer höheren Geschwindigkeit und längerer Dauer laufen (60 min bei 30 m/min und 0° Steigung) und zeigten dadurch eine Verbesserung der trabekulären Mikroarchitektur, die sich in einer Erhöhung der Tb.N und Tb.Th bzw. einer Abnahme der Tb.Sp in der distalen femoralen Metaphyse widerspiegelte [Joo et al. 2003]. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen aus vorliegender Arbeit und zeigt,

dass ein intensives Training mit hohen Bodenreaktionskräften notwendig ist, um einen positiven Effekt auf die Knochenstruktur zu generieren [Huang et al. 2008].

Warner und Kollegen untersuchten die unterschiedlichen Auswirkungen von Übungen mit bzw. ohne Gewichtsbelastung auf das kortikale und trabekuläre Femur, indem sie laufende mit schwimmenden Sprague Dawley Ratten verglichen [Warner et al. 2006]. Dabei konnte bei dem verwendeten Trainingsprotokoll (60 min/d bei einer Geschwindigkeit von 17 m/min und einer Steigung von 8,5° für 12 Wochen) im Gegensatz zu vorliegender Arbeit kein Effekt auf die Spongiosa und die kortikale Knochenmineraldichte nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte wiederum die zu geringe Geschwindigkeit sein (17 m/min vs. 28 m/min).

Tamaki und Kollegen wiederum beurteilten den Effekt von Laufbandtraining und Bisphosphonat Applikation auf die Knochenmineraldichte von Femur und Spongiosa der Tibia bei ovariectomierten Wistar Ratten [Tamaki et al. 1998]. Sie konnten bei einem intensiveren Training mit höherer Geschwindigkeit (60 min/d bei einer Geschwindigkeit von 30 m/min für 10 Wochen und 0° Steigung) eine Erhöhung der BMD bei Femur und Tibia im Vergleich zu ovariectomierten Tieren feststellen.

Einen entscheidenden Einfluss auf die Knochenregeneration spielen mechanische Stimuli, die bei gewichtsbelastenden Trainingsformen wie Laufen besonders ausgeprägt sind. In einer Studie von Hagihara und Kollegen wurde die Struktur von verschiedenen Knochen nach Lauftraining bei heranwachsenden Ratten untersucht. Während die Knochenmineraldichte von Tibia und Femur zunahm, blieb die des zweiten Lendenwirbelkörpers unverändert [Hagihara et al. 2005]. Iwamoto und Kollegen folgerten, dass diese knochenspezifischen Unterschiede vom größeren Abstand von Femur und Tibia zum Rattenrumpf herrühren. Dies ist mit einer höheren Traglast verbunden, was diese Knochen empfindlicher auf mechanische Stimuli wie Laufen reagieren lässt [Iwamoto et al. 1999]. Hamann und Kollegen untersuchten den Effekt von level und downhill Laufen auf die femorale Metaphyse von heranwachsenden weiblichen Ratten [Hamann et al. 2012]. Dort führte downhill Laufen zu einer Steigerung der trabekulären Knochendichte. Die kortikale Knochenmineraldichte blieb sowohl von downhill, als auch von level Laufen unbeeinflusst. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus vorliegender Arbeit. Allerdings konnte bei Hamann und Kollegen im Gegensatz zu vorliegender Studie die Knochendichte durch level Laufen nicht gesteigert werden. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass die Tibia distaler als das Femur gelegen ist und somit die Krafteinwirkung höher ist [Iwamoto et al. 1999]. Ein anderer Grund könnte das

unterschiedliche Geschlecht sein. So ist bekannt, dass die ossäre Reaktionsfreudigkeit von männlichen Nagetieren auf Lauftraining ausgeprägter als die von weiblichen Tieren ist [Wallace et al. 2007].

Neben dem eigenen Gewicht bzw. der Gravitation als mechanischen Stimulus sind die Zugkräfte des Muskels auf den Knochen während der Kontraktion von großer Bedeutung. Der Zusammenhang zwischen Muskelkraft und Knochenfestigkeit wurde von Frost als Mechanostat-Modell beschrieben. Nach diesem Modell werden die durch die Muskelkräfte ausgelösten Verformungen des Knochens durch Osteozyten detektiert. Wird der Knochen nicht regelmäßig über einen bestimmten Schwellenwert verformt, kommt es zu einem Verlust an Knochenmasse und Festigkeit. Wird ein weiterer, höherer Schwellenwert überschritten, wird Knochen aufgebaut und die Festigkeit erhöht, um Schädigungen durch die erhöhten Belastungen zu vermeiden [Frost 2003]. Die größten auf den Knochen einwirkenden Kräfte werden durch die Zugkräfte des Muskels an den Sehnenansatzpunkten verursacht und nicht durch das eigene Körpergewicht [Rittweger et al. 2005]. Dies konnte anhand einer in vivo Studie gezeigt werden, bei der Hüftimplantate mit telemetrisch gesteuerten Messwandlern ausgestattet wurden, um die auftretenden Kräfte während eines normalen Gangzyklus zu messen. Demnach wurden über 70% der auftretenden Biegemomente auf den Knochen durch Muskelkraft übertragen und weniger als 30% ließen sich durch das Körpergewicht ableiten [Lu et al. 1997]. Hamrick und Kollegen untersuchten in einer anderen Studie die mechanischen Eigenschaften des Radius von Myostatin-knockout-Mäusen nach Lauftraining [Hamrick et al. 2006]. Trainierte Myostatin-defizitäre Mäuse hatten signifikant bessere Werte im Vergleich zu untrainierten Kontrolltieren, wohingegen beim Wildtyp kein statistisch relevanter Anstieg nach Training zu verzeichnen war. Sie postulierten daher, dass die durch Hemmung von Myostatin resultierende erhöhte Muskelmasse den positiven Effekt von Lauftraining auf die Knochenfestigkeit verbessert.

Beim uphill Laufen werden die beteiligten Muskeln überwiegend konzentrisch, beim downhill Laufen exzentrisch kontrahiert. Eine konzentrische Kontraktion führt zu einer Muskelhypertrophie bzw. zu einer Muskelquerschnittszunahme. Downhill Laufen führt durch die erhöhten Aufprallkräfte zu einer hohen mechanischen Belastung des skelettalen Systems der unteren Extremität. Außerdem sind höhere Anteile von exzentrischen Muskelkontraktionen mit höheren Kräften auf den Knochen verbunden, was zu einer erhöhten Knochenmasse führt [Hawkins et al. 1999; Schroeder et al. 2004]. Es ist

daher anzunehmen, dass uphill und downhill die Knochenregeneration in besonderem Maße vorantreiben. Diese Annahme wurde durch vorliegende Arbeit jedoch nicht bestätigt. Anhand der  $\mu$ -CT Analyse der Kortikalis und Spongiosa konnten keine wesentlichen Unterschiede von uphill, level und downhill festgestellt werden. Es ist bekannt, dass Testosteron zusammen mit Wachstumshormon, dem Insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF-I), Insulin und Kortisol die adaptiven Veränderungen im Muskel nach Krafttraining vermitteln [Kraemer et al. 1990; Tipton und Wolfe 2001]. Durch den Ausfall der testikulären Testosteronsynthese nach ORX in vorliegender Arbeit könnte es daher zu einer Abnahme der Muskelkraft gekommen sein. Dies steht im Einklang mit einer Studie, bei der die Muskelkraftzunahme nach Krafttraining durch medikamentöse Suppression von Testosteron stark abgeschwächt wurde [Kvorning et al. 2006]. Die verminderte Muskelkraft könnte wiederum dazu geführt haben, dass der osteogene Effekt durch die Kontraktion der beteiligten Muskeln beim Lauftraining in vorliegender Arbeit nicht so ausgeprägt war.

Körperliche Betätigungen wie Laufen oder Gewichtheben führen zu einer erhöhten Knochenneubildungsrate, indem die Rekrutierung und Aktivität von Osteoblasten gesteigert wird [Eliakim et al. 1997; Bourrin et al. 1995; Barengolts et al. 1994]. Osteoklasten werden ebenfalls durch mechanische Stimuli beeinflusst, indem die RANKL-Synthese reduziert und somit die Osteoklastenzahl verringert wird [Rubin et al. 2000; Rubin et al. 1997]. Da in vorliegender Arbeit keine direkten Parameter des Knochenmetabolismus erhoben wurden, ist nicht klar, ob die knochenerhaltende Wirkung des Lauftrainings hauptsächlich auf eine erhöhte Neubildung durch gesteigerte Osteoblastenaktivität oder durch eine Minderung der Resorption aufgrund der Verringerung von Osteoklasten zurückzuführen ist. Yeh und Kollegen fanden jedoch in einer ähnlichen Studie, dass Laufbandtraining bei ovariectomierten Ratten zu einer Verringerung von Resorptionsmarkern führt und keinen signifikanten Effekt auf die Knochenneubildung hat [Yeh et al. 1993]. Sie postulierten daher, dass Laufbandtraining v.a. die Knochenresorption supprimiert.

Die Hauptkomplikation von Osteoporose stellen Frakturen dar, die aufgrund verminderter Knochenfestigkeit ohne adäquate Krafteinwirkung auftreten. Die Knochenmineraldichte (v.a. die der Kortikalis) stellt einen bestimmenden Faktor der Knochenfestigkeit dar [Ammann und Rizzoli 2003]. Im 3-Punkt-Biegeversuch kann die Knochenfestigkeit anhand der maximalen Haltekraft und Biegesteifigkeit ausgedrückt werden. In vorlie-

gender Studie konnte die kortikale BMD nach Kastration nur durch uphill Laufen gesteigert werden. Diese erhöhte BMD spiegelt sich im Biegeversuch nur in einer erhöhten Biegesteifigkeit in der uphill-Gruppe wider. Interessanterweise steigerte auch downhill Laufen die Biegesteifigkeit statistisch relevant, obwohl die kortikale BMD davon unbeeinflusst blieb. Analog dazu fanden Maurel und Kollegen, dass körperliche Bewegung (Dauer: 14 Wochen, Höchstdauer pro Trainingseinheit: 60 min,  $V_{\max}$ : 20 m/min, 0° Steigung) den schädlichen Einfluss von Alkohol auf den trabekulären und kortikalen Knochen in männlichen Wistar Ratten zwar limitieren kann, sich dies im 3-Punkt-Biegeversuch aber nicht widerspiegelt [Maurel et al. 2013]. Die maximale Haltekraft und Biegesteifigkeit konnte dort wie in vorliegender Arbeit durch level Laufen nicht positiv beeinflusst werden.

Andererseits berichten Turner und Robling, dass sich die biomechanischen Eigenschaften des Knochens trotz geringfügig veränderter BMD durch Belastung bedeutend steigern lassen [Turner und Robling 2005]. Dies könnte zudem auch an einer Veränderung der Mikroarchitektur, wie eine veränderte Ausrichtung von Kollagenfasern liegen, was ebenfalls einen Faktor für die Knochenfestigkeit und –steifigkeit darstellt [Martin und Boardman 1993].

### 5.3 Klinische Relevanz

Mit vorliegender Arbeit konnte der therapeutische Effekt von uphill, level und downhill Laufen auf den osteoporotisch veränderten Knochen gezeigt werden. Es ist jedoch grundsätzlich schwierig die knochenstärkenden Effekte, die durch die mechanische Belastung des Knochens bei Lauftraining in Labortieren auftreten, in ein wirksames Therapieregime gegen Osteoporose beim Menschen zu übersetzen. Osteoporose ist eine Krankheit des hohen Alters und Knochengewebe wirkt mit zunehmendem Alter weniger empfindlich auf mechanische Reize. Außerdem sind es v.a. gewichtsbelastende Aktivitäten, wie Springen oder Laufen, die ein hohes osteogenes Potential aufweisen. Leider ist es für ältere Menschen oft schwierig, solche Tätigkeiten auszuführen. Downhill Laufen bzw. Gehen stellt eine besonders hohe Beanspruchung für das muskuloskelettale System dar. Wie gezeigt werden konnte, ist downhill Laufen jedoch nicht unbedingt Erfolg versprechender und es kann auf schonendere Formen ausgewichen werden.

In klinischen Studien mit postmenopausalen Frauen mit Osteoporose konnten bereits erfolgreich Trainingsprotokolle für das Laufband umgesetzt werden [Roghani et al. 2013; Gunendi et al. 2008; Chien et al. 2000]. Dabei wurde, ganz ähnlich dem vorliegenden Intervalltraining, ein abgestuftes Training verwendet, bei dem die Probandinnen nach einer Aufwärmphase mit einer höheren Intensität auf dem Laufband trainieren mussten. Roghani und Kollegen konnten bei ihrem Protokoll (3 Mal pro Woche 30 min für insgesamt 6 Wochen) eine Stimulation der Knochensynthese und einen Rückgang der Resorption beobachten [Roghani et al. 2013]. Gunendi und Kollegen zeigten, dass 30 minütiges Laufbandtraining, zwei Mal pro Woche für 4 Wochen die Haltung und das Gleichgewicht der Frauen verbesserte, was das Sturzrisiko verringert [Gunendi et al. 2008]. Chien und Kollegen fanden, dass sich bei ihrem Setting (3 mal wöchentliches Training für jeweils 50 min bei einer Gesamtdauer von 24 Wochen) ein Rückgang der Knochenmineraldichte aufhalten ließ [Chien et al. 2000]. Dieser Auszug aus klinischen Studien mit ähnlichem Studiendesign zeigt, dass der tierexperimentelle Ansatz aus vorliegender Arbeit durchaus auf den Menschen übertragbar und praxisrelevant ist.

In Anbetracht der demografischen Entwicklung werden zwar immer mehr Menschen immer älter, aber gleichzeitig ist auch zu beobachten, dass sich immer mehr Menschen einer stetig verbesserten Gesundheit erfreuen. Von daher wird die Mehrheit in der Lage sein, sich auch im hohen Alter sportlich zu betätigen. Infolgedessen kann Lauftraining einen attraktiven adjuvanten Therapieansatz zu den anderen Behandlungsmöglichkeiten der Osteoporose darstellen. Für die Praxis sei diese Studie also als klare Aufforderung zu verstehen, die Patienten zu mehr Bewegung zu motivieren.

## 5.4 Limitationen und Ausblick

Die vorliegende experimentelle Arbeit untersuchte die Pathophysiologie der osteoporotischen Veränderungen nach Testosteronmangel und die Mechanismen, die zur verbesserten Regeneration nach Lauftraining führten. Die Untersuchungen fokussierten sich auf strukturelle und funktionelle Parameter nach Kastration und Durchführung des Lauftrainings. Die zugrunde liegenden molekularen Vorgänge der Regeneration wurden dabei nicht untersucht.

Weiterhin wurde nur die hintere Extremität anhand der Tibia analysiert. Da beim quadrupedalen Laufen auch die vordere Extremität beansprucht wird, könnten in weiterführenden Untersuchungen auch Knochen des Vorderlaufs untersucht werden. Außerdem könnte die Adaptionfähigkeit verschiedener Knochen, wie z.B. Tibia und Femur gegenübergestellt werden.

Die jeweilige Maximalgeschwindigkeit der Laufgruppen wurde nur subjektiv aufgrund des individuellen Laufverhaltens der Tiere festgelegt. In nachfolgenden Arbeiten könnte die Leistungsfähigkeit der Versuchstiere anhand geeigneter Parameter wie der maximalen Sauerstoffaufnahme ( $VO_{2max}$ ) quantifiziert werden.

Ferner wurde der Knochenabbau nicht durch biochemische Marker der Knochenresorption gemessen. Zukünftige Studien könnten die Bestimmung von z.B. Desoxypyridinolin im Urin mit einschließen.

Schlussfolgernd kann man postulieren, dass Lauftraining einen positiv osteogenen Effekt besitzt und somit eine schützende und erhaltende Wirkung auf den osteoporotischen Knochen hat. Dabei hat sich weder uphill, downhill oder level Laufen als besonders vorteilhaft gezeigt.



## 6 THESEN

**Thema:**

### **Regenerative Eigenschaften von Laufbandtraining auf die Knochenstruktur der kastrierten Ratte**

- Osteoporose und deren Folgezustände stellen im Hinblick auf eine zunehmend älter werdende Bevölkerung ein wesentliches Problem im Gesundheitswesen dar.
- Der entscheidende Faktor für die Entstehung von Osteoporose bei Männern ist ein Abfall des Serum-Testosteronspiegels im Rahmen der Andropause.
- Die chirurgische Kastration (Orchiektomie) der männlichen Ratte führt zu einer fast vollständigen Deprivation des Serum-Testosteronspiegels und ist das am häufigsten verwendete Tiermodell, um eine Andropause bzw. Osteoporose zu induzieren.
- Sportliche Betätigung zählt zu den präventiven Maßnahmen, um die Entstehung von Osteoporose zu vermeiden. Hierbei sind es v.a. gewichtsbelastende Übungen, wie Laufen, die ein hohes osteogenes Potential besitzen. Neben der mechanischen Belastung haben die Zugkräfte des Muskels auf den Knochen während der Kontraktion einen entscheidenden positiven Einfluss auf die morphologischen und mechanischen Eigenschaften des Knochens.
- Die Laufmodalitäten uphill, level und downhill stellen hinsichtlich der unterschiedlichen Belastung durch das Körpergewicht sowie den verschiedenen Anteilen an konzentrischen und exzentrischen Muskelkontraktionen jeweils ein anderes Reizmuster auf den Knochen dar.
- Ziel dieser Arbeit war es, die Regenerationskapazität des Knochens nach uphill, level und downhill Laufbandtraining in einem Tiermodell der Osteoporose zu evaluieren. Hierfür wurden strukturelle und funktionelle Parameter von Kortikalis und Spongiosa analysiert.

- Die Kastration führt 4, 8 und 12 Wochen postoperativ zu einem Abfall des Serum-Testosteronspiegels unterhalb der Nachweisgrenze.
- Das kortikale Knochenvolumen zeigt keine Unterschiede innerhalb der Gruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten. Die kortikale Knochenmineraldichte nimmt nach der Kastration ebenfalls nicht ab. Hingegen kann die Knochenmineraldichte der Kortikalis durch uphill und downhill Training im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich erhöht werden.
- Trabekuläres Volumen, trabekuläre Anzahl und trabekuläre Knochenmineraldichte werden durch die Kastration massiv gemindert. Durch alle drei Laufmodalitäten kann der durch die Kastration bedingte Verlust von trabekulärem Knochenvolumen, trabekulärer Anzahl und trabekulärer Knochenmineraldichte auf das Niveau von sham-kastrierten Tieren wiederhergestellt werden.
- Der Einfluss von Kastration und Laufbandtraining ist im spongiösen Knochen deutlich ausgeprägter als im kortikalen Knochen.
- Eine Reduktion der biomechanischen Eigenschaften des Knochens nach Kastration drückt sich durch eine reduzierte Biegesteifigkeit und maximale Haltekraft 8 und 12 Wochen postoperativ aus. Die reduzierte Biegesteifigkeit kann durch uphill Training auf das Niveau der Kontrollgruppe wiederhergestellt werden. Die maximale Haltekraft wird durch das Lauftraining nicht beeinflusst.
- Lauftraining ist geeignet, den Knochenschwund bei Osteoporose aufzuhalten. Dies ist unabhängig von der jeweiligen Trainingsmethode. Laufbandtraining stellt somit einen attraktiven adjuvanten Therapieansatz im Management von Patienten mit Osteoporose dar.

## 7 LITERATUR

- Abu EO, Horner A, Kusec V, Triffitt JT, Compston JE. The localization of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(10): 3493–3497.
- Adams JE. Advances in bone imaging for osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 9(1): 28–42.
- Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 1998; 139(2): 663–670.
- Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int* 2003; 14 Suppl 3: S13–8.
- Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1983; 54(1): 80–93.
- Athanasiau KA, Zhu C, Lanctot DR, Agrawal CM, Wang X. Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. *Tissue Eng* 2000; 6(4): 361–381.
- Barengolts EI, Lathon PV, Curry DJ, Kukreja SC. Effects of endurance exercise on bone histomorphometric parameters in intact and ovariectomized rats. *Bone Miner* 1994; 26(2): 133–140.
- Barlet JP, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N. Animal models of post-menopausal osteoporosis. *Reprod Nutr Dev* 1994; 34(3): 221–236.
- Barry DW, Kohrt WM. BMD decreases over the course of a year in competitive male cyclists. *J Bone Miner Res* 2008; 23(4): 484–491.
- Beaupied H, Lespessailles E, Benhamou C. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. *Joint Bone Spine* 2007; 74(3): 233–239.
- Benito M, Gomberg B, Wehrli FW, Weening RH, Zemel B, Wright AC, Song HK, Cucchiara A, Snyder PJ. Deterioration of trabecular architecture in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(4): 1497–1502.
- Berruti A, Dogliotti L, Terrone C, Cerutti S, Isaia G, Tarabuzzi R, Reimondo G, Mari M, Ardisson P, Luca S de, Fasolis G, Fontana D, Rossetti SR, Angeli A. Changes in bone mineral density, lean body mass and fat content as measured by dual energy x-ray absorptiometry in patients with prostate cancer without apparent bone metastases given androgen deprivation therapy. *J Urol* 2002; 167(6): 2361–7; discussion 2367.
- Bhasin S, Taylor WE, Singh R, Artaza J, Sinha-Hikim I, Jasuja R, Choi H, Gonzalez-Cadavid NF. The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58(12): M1103–10.
- Bikle DD, Halloran BP. The response of bone to unloading. *J Bone Miner Metab* 1999; 17(4): 233–244.
- Blanchard O, Tsagris L, Rappaport R, Duval-Beaupere G, Corvol M. Age-dependent responsiveness of rabbit and human cartilage cells to sex steroids in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40(4–6): 711–716.
- Bonel HM, Lochmüller E, Well H, Kuhn V, Hudelmaier M, Reiser M, Eckstein F. Multislice computed tomography of the distal radius metaphysis: relationship of cortical bone structure with gender, age, osteoporotic status, and mechanical competence. *J Clin Densitom* 2004; 7(2): 169–182.
- Bonnet N, Laroche N, Vico L, Dolleans E, Courteix D, Benhamou CL. Assessment of trabecular bone microarchitecture by two different x-ray microcomputed tomographs: a comparative study of the rat distal tibia using Skyscan and Scanco devices. *Med Phys* 2009; 36(4): 1286–1297.

- Borst SE, Conover CF. Orchiectomized Fischer 344 male rat models body composition in hypogonadal state. *Life Sci* 2006; 79(4): 411–415.
- Boudenot A, Pallu S, Lespessailles E, Jaffré C. Effets de l'entraînement intermittent sur la composition corporelle, la masse et la densité minérale osseuses chez le rat. *Science & Sports* 2012; 27(3): 188–191.
- Bourrin S, Genty C, Palle S, Gharib C, Alexandre C. Adverse effects of strenuous exercise: a densitometric and histomorphometric study in the rat. *J Appl Physiol* (1985) 1994; 76(5): 1999–2005.
- Bourrin S, Palle S, Pupier R, Vico L, Alexandre C. Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. *J Bone Miner Res* 1995; 10(11): 1745–1752.
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010; 25(7): 1468–1486.
- Broulik PD, Rosenkrancova J, Ruzicka P, Sedlacek R. Effect of alendronate administration on bone mineral density and bone strength in castrated rats. *Horm Metab Res* 2005; 37(7): 414–418.
- Broulik PD, Rosenkrancova J, Ruzicka P, Sedlacek R, Kurcova I. The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content and bone strength in normal and castrated male rats. *Horm Metab Res* 2007; 39(1): 20–24.
- Buehring B, Viswanathan R, Binkley N, Busse W. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on effects and management. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 132(5): 1019–1030.
- Buie HR, Boyd SK. Reduced bone mass accrual in swim-trained prepubertal mice. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 42(10): 1834–1842.
- Burr DB. Muscle strength, bone mass, and age-related bone loss. *J Bone Miner Res* 1997; 12(10): 1547–1551.
- Burr DB, Forwood MR, Fyhrie DP, Martin RB, Schaffler MB, Turner CH. Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures. *J Bone Miner Res* 1997; 12(1): 6–15.
- Burstein AH, Frankel VH. A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 1971; 4(2): 155–158.
- Butterfield TA, Leonard TR, Herzog W. Differential serial sarcomere number adaptations in knee extensor muscles of rats is contraction type dependent. *J Appl Physiol* (1985) 2005; 99(4): 1352–1358.
- Capaday C. The special nature of human walking and its neural control. *Trends Neurosci* 2002; 25(7): 370–376.
- Carrascosa A, Audi L, Ferrandez MA, Ballabriga A. Biological effects of androgens and identification of specific dihydrotestosterone-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(1): 134–140.
- Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA. Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet* 1999; 353(9156): 878–882.
- Chappard D, Retailleau-Gaborit N, Legrand E, Basle MF, Audran M. Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT. *J Bone Miner Res* 2005; 20(7): 1177–1184.
- Chen X, Aoki H, Fukui Y. Effect of exercise on the bone strength, bone mineral density, and metal content in rat femurs. *Biomed Mater Eng* 2004; 14(1): 53–59.
- Cheung, Kenneth M C, Kaluarachi K, Andrew G, Lu W, Chan D, Cheah, Kathryn S E. An externally fixed femoral fracture model for mice. *J Orthop Res* 2003; 21(4): 685–690.
- Chiang C, Chiu M, Moore AJ, Anderson PH, Ghasem-Zadeh A, McManus JF, Ma C, Seeman E, Clemens TL, Morris HA, Zajac JD, Davey RA. Mineralization and

- bone resorption are regulated by the androgen receptor in male mice. *J. Bone Miner. Res.* 2009; 24(4): 621–631.
- Chien MY, Wu YT, Hsu AT, Yang RS, Lai JS. Efficacy of a 24-week aerobic exercise program for osteopenic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2000; 67(6): 443–448.
- Cicuttini FM, Wluka A, Bailey M, O'Sullivan R, Poon C, Yeung S, Ebeling PR. Factors affecting knee cartilage volume in healthy men. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(2): 258–262.
- Cooper C, Melton, L J 3rd. Epidemiology of osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab* 1992; 3(6): 224–229.
- Cooper, D M L, Matyas JR, Katzenberg MA, Hallgrimsson B. Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Calcif Tissue Int* 2004; 74(5): 437–447.
- Cummings SR, Black DM, Nevitt MC, Browner W, Cauley J, Ensrud K, Genant HK, Palermo L, Scott J, Vogt TM. Bone density at various sites for prediction of hip fractures. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Lancet* 1993; 341(8837): 72–75.
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol* 2008; 61(5): 577–587.
- De La Piedra, Concepcion, Quiroga I, Montero M, Dapia S, Caeiro JR, Rubert M, Diaz-Curiel M, Bauss F. Daily or monthly ibandronate prevents or restores deteriorations of bone mass, architecture, biomechanical properties and markers of bone turnover in androgen-deficient aged rats. *Aging Male* 2011; 14(4): 220–230.
- DiVasta AD, Gordon CM. Exercise and bone: where do we stand? *Metabolism* 2013; 62(12): 1714–1717.
- Doll B, Sfeir C, Winn S, Huard J, Hollinger J. Critical aspects of tissue-engineered therapy for bone regeneration. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2001; 11(1-3): 173–198.
- Ebeling PR. Clinical practice. Osteoporosis in men. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358(14): 1474–1482.
- Ebeling PR. Osteoporosis in men. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25(4): 542–552.
- Ekeberg O, Pearson K. Computer simulation of stepping in the hind legs of the cat: an examination of mechanisms regulating the stance-to-swing transition. *J Neurophysiol* 2005; 94(6): 4256–4268.
- Eliakim A, Raisz LG, Brasel JA, Cooper DM. Evidence for increased bone formation following a brief endurance-type training intervention in adolescent males. *J Bone Miner Res* 1997; 12(10): 1708–1713.
- Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W. Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure. *Radiologe* 1999; 39(3): 203–212.
- Ensrud KE, Walczak TS, Blackwell TL, Ensrud ER, Barrett-Connor E, Orwoll ES. Antiepileptic drug use and rates of hip bone loss in older men: a prospective study. *Neurology* 2008; 71(10): 723–730.
- Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 2000; 15(6): 1085–1098.
- Erben RG, Eberle J, Stangassinger M. B lymphopoiesis is upregulated after orchiectomy and is correlated with estradiol but not testosterone serum levels in aged male rats. *Horm Metab Res* 2001; 33(8): 491–498.
- Ferrando AA, Sheffield-Moore M, Paddon-Jones D, Wolfe RR, Urban RJ. Differential anabolic effects of testosterone and amino acid feeding in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(1): 358–362.

- Finì M, Salamanna F, Veronesi F, Torricelli P, Nicolini A, Benedicenti S, Carpi A, Giavaresi G. Role of obesity alcohol and smoking on bone health. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 4: 2686–2706.
- Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM, Greenspan SL, Rosenthal DI, Crowley W F Jr. Osteoporosis in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Ann Intern Med* 1987; 106(3): 354–361.
- Finkelstein JS, Neer RM, Biller BM, Crawford JD, Klibanski A. Osteopenia in men with a history of delayed puberty. *N Engl J Med* 1992; 326(9): 600–604.
- Fleisch H. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur Spine J* 2003; 12 Suppl 2: S142-6.
- Fowler, William M Jr. Role of physical activity and exercise training in neuromuscular diseases. *Am J Phys Med Rehabil* 2002; 81(11 Suppl): S187-95.
- Franklin M, Bu SY, Lerner MR, Lancaster EA, Bellmer D, Marlow D, Lightfoot SA, Arjmandi BH, Brackett DJ, Lucas EA, Smith BJ. Dried plum prevents bone loss in a male osteoporosis model via IGF-I and the RANK pathway. *Bone* 2006; 39(6): 1331–1342.
- Fritton JC, Myers ER, Wright TM, van der Meulen, M C H. Loading induces site-specific increases in mineral content assessed by microcomputed tomography of the mouse tibia. *Bone* 2005; 36(6): 1030–1038.
- Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003; 275(2): 1081–1101.
- Genant HK, Cooper C, Poor G, Reid I, Ehrlich G, Kanis J, Nordin BE, Barrett-Connor E, Black D, Bonjour JP, Dawson-Hughes B, Delmas PD, Dequeker J, Ragi Eis S, Gennari C, Johnell O, Johnston, C C Jr, Lau EM, Liberman UA, Lindsay R, Martin TJ, Masri B, Mautalen CA, Meunier PJ, Khaltaev N. Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis. *Osteoporos Int* 1999; 10(4): 259–264.
- Goulding A, Gold E. Flutamide-mediated androgen blockade evokes osteopenia in the female rat. *J Bone Miner Res* 1993; 8(6): 763–769.
- Gradosova I, Zivna H, Palicka V, Hubena S, Svejtkovska K, Zivny P. Protective effect of atorvastatin on bone tissue in orchidectomised male albino Wistar rats. *Eur J Pharmacol* 2012; 679(1-3): 144–150.
- Gunendi Z, Ozyemisci-Taskiran O, Demirsoy N. The effect of 4-week aerobic exercise program on postural balance in postmenopausal women with osteoporosis. *Rheumatol Int* 2008; 28(12): 1217–1222.
- Gunness M, Orwoll E. Early induction of alterations in cancellous and cortical bone histology after orchiectomy in mature rats. *J Bone Miner Res* 1995; 10(11): 1735–1744.
- Haentjens P. Meta-analysis: Excess Mortality After Hip Fracture Among Older Women and Men. *Ann Intern Med* 2010; 152(6): 380.
- Hagihara Y, Fukuda S, Goto S, Iida H, Yamazaki M, Moriya H. How many days per week should rats undergo running exercise to increase BMD? *J Bone Miner Metab* 2005; 23(4): 289–294.
- Hamann N, Kohler T, Müller R, Bruggemann G, Niehoff A. The effect of level and downhill running on cortical and trabecular bone in growing rats. *Calcif Tissue Int* 2012; 90(5): 429–437.
- Hamrick MW, Samaddar T, Pennington C, McCormick J. Increased muscle mass with myostatin deficiency improves gains in bone strength with exercise. *J Bone Miner Res* 2006; 21(3): 477–483.
- Hanna F, Ebeling PR, Wang Y, O'Sullivan R, Davis S, Wluka AE, Cicuttini FM. Factors influencing longitudinal change in knee cartilage volume measured from magnetic resonance imaging in healthy men. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(7): 1038–1042.

- Harrigan TP, Mann RW. Characterization of microstructural anisotropy in orthotropic materials using a second rank tensor. *J Mater Sci* 1984; 19(3): 761–767.
- Hawkins SA, Schroeder ET, Wiswell RA, Jaque SV, Marcell TJ, Costa K. Eccentric muscle action increases site-specific osteogenic response. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31(9): 1287–1292.
- Heer M, Baecker N, Mika C, Boese A, Gerzer R. Immobilization induces a very rapid increase in osteoclast activity. *Acta Astronaut* 2005; 57(1): 31–36.
- Herold G. *Innere Medizin* 2010. S. 738. Köln: Selbstverl; 2010.
- Hildebrand T, Rüegsegger P. A new method for the model-independent assessment of thickness in three-dimensional images. *J Microsc* 1997; 185(1): 67–75.
- Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9(1): 58–65.
- Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292(4): 490–495.
- Hosoido T. Qualitative Comparison between Rats and Humans in Quadrupedal and Bipedal Locomotion. *JBBS* 2013; 03(01): 137–149.
- Hou JC, Salem GJ, Zernicke RF, Barnard RJ. Structural and mechanical adaptations of immature trabecular bone to strenuous exercise. *J Appl Physiol* (1985) 1990; 69(4): 1309–1314.
- Huang T, Chang F, Lin S, Liu S, Hsieh SS, Yang R. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. *J Bone Miner Metab* 2008; 26(4): 350–357.
- Huhtaniemi I. Late-onset hypogonadism: Current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment. *Asian J. Androl.* 2013.
- Ip TY, Peterson J, Byrner R, Tou JC. Bone responses to body weight and moderate treadmill exercising in growing male obese (fa/fa) and lean Zucker rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9(3): 155–166.
- Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone* 1999; 24(3): 163–169.
- Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001; 1(3): 193–207.
- Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2006; 17(12): 1726–1733.
- Joo Y, Sone T, Fukunaga M, Lim S, Onodera S. Effects of endurance exercise on three-dimensional trabecular bone microarchitecture in young growing rats. *Bone* 2003; 33(4): 485–493.
- Kaastad TS, Nordsletten L, Narum S, Madsen JE, Haug E, Reikeras O. Training increases the in vivo fracture strength in osteoporotic bone. Protection by muscle contraction examined in rat tibiae. *Acta Orthop Scand* 1996; 67(4): 371–376.
- Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15(3): 175–191.
- Kannus P. Preventing osteoporosis, falls, and fractures among elderly people. Promotion of lifelong physical activity is essential. *BMJ* 1999; 318(7178): 205–206.
- Kaufman J, Audran M, Bianchi G, Braga V, Diaz-Curiel M, Francis RM, Goemaere S, Josse R, Palacios S, Ringe JD, Felsenberg D, Boonen S. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2013 b; 98(2): 592–601.
- Kaufman J, Reginster J, Boonen S, Brandi ML, Cooper C, Dere W, Devogelaer J, Diez-Perez A, Kanis JA, McCloskey E, Mitlak B, Orwoll E, Ringe JD, Weryha G, Rizzoli R. Treatment of osteoporosis in men. *Bone* 2013 a; 53(1): 134–144.

- Kerschan-Schindl K, Patsch J, Kudlacek S, Gleiss A, Pietschmann P. Measuring quality of life with the German Osteoporosis Quality of Life Questionnaire in women with osteoporosis. *Wien Klin Wochenschr* 2012; 124(15-16): 532–537.
- Kiebzak GM, Beinart GA, Perser K, Ambrose CG, Siff SJ, Heggeness MH. Undertreatment of osteoporosis in men with hip fracture. *Arch Intern Med* 2002; 162(19): 2217–2222.
- Koelling S, Miosge N. Sex differences of chondrogenic progenitor cells in late stages of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010; 62(4): 1077–1087.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397(6717): 315–323.
- Kontulainen S, Sievanen H, Kannus P, Pasanen M, Vuori I. Effect of long-term impact-loading on mass, size, and estimated strength of humerus and radius of female racquet-sports players: a peripheral quantitative computed tomography study between young and old starters and controls. *J Bone Miner Res* 2002; 17(12): 2281–2289.
- Kraemer WJ, Marchitelli L, Gordon SE, Harman E, Dziados JE, Mello R, Frykman P, McCurry D, Fleck SJ. Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. *J Appl Physiol* (1985) 1990; 69(4): 1442–1450.
- Krohn K, Haffner D, Hugel U, Himmele R, Klaus G, Mehls O, Schaefer F. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif Tissue Int* 2003; 73(4): 400–410.
- Kvorning T, Andersen M, Brixen K, Madsen K. Suppression of endogenous testosterone production attenuates the response to strength training: a randomized, placebo-controlled, and blinded intervention study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291(6): E1325–32.
- Lanyon LE, Rubin CT. Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J Biomech* 1984; 17(12): 897–905.
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 2008; 58(5): 424–430.
- Leppanen OV, Sievanen H, Jokihaara J, Pajamaki I, Kannus P, Jarvinen, Teppo L N. Pathogenesis of age-related osteoporosis: impaired mechano-responsiveness of bone is not the culprit. *PLoS One* 2008; 3(7): e2540.
- Lin JT, Lane JM. Osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res* 2004(425): 126–134.
- Lindberg MK, Erlandsson M, Alatalo SL, Windahl S, Andersson G, Halleen JM, Carlsten H, Gustafsson JA, Ohlsson C. Estrogen receptor alpha, but not estrogen receptor beta, is involved in the regulation of the OPG/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF-kappa B ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. *J Endocrinol* 2001; 171(3): 425–433.
- Looker AC, Orwoll ES, Johnston, C C Jr, Lindsay RL, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP. Prevalence of low femoral bone density in older U.S. adults from NHANES III. *J Bone Miner Res* 1997; 12(11): 1761–1768.
- Lu TW, Taylor SJ, O'Connor JJ, Walker PS. Influence of muscle activity on the forces in the femur: an in vivo study. *J Biomech* 1997; 30(11-12): 1101–1106.
- Lynn R, Morgan DL. Decline running produces more sarcomeres in rat vastus intermedius muscle fibers than does incline running. *J Appl Physiol* (1985) 1994; 77(3): 1439–1444.
- Lynn R, Talbot JA, Morgan DL. Differences in rat skeletal muscles after incline and decline running. *J Appl Physiol* (1985) 1998; 85(1): 98–104.



- Ma H, Blanchet TJ, Peluso D, Hopkins B, Morris EA, Glasson SS. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15(6): 695–700.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 115–137.
- Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ* 1996; 312(7041): 1254–1259.
- Martin RB, Boardman DL. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. *J Biomech* 1993; 26(9): 1047–1054.
- Martin-Badosa E, Amblard D, Nuzzo S, Elmoutaouakkil A, Vico L, Peyrin F. Excised bone structures in mice: imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro CT. *Radiology* 2003; 229(3): 921–928.
- Maurel DB, Boisseau N, Pallu S, Rochefort GY, Benhamou C, Jaffre C. Regular exercise limits alcohol effects on trabecular, cortical thickness and porosity, and osteocyte apoptosis in the rat. *Joint Bone Spine* 2013; 80(5): 492–498.
- Mazwell M. Cancer nursing bibliography. *Oncol Nurs Forum* 1978; 5(4): 17–19.
- Metcalfe D. The pathophysiology of osteoporotic hip fracture. *Mcgill J Med* 2008; 11(1): 51–57.
- Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD, Cannata J, Balogh A, Lemmel E, Pors-Nielsen S, Rizzoli R, Genant HK, Reginster J. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2004; 350(5): 459–468.
- Michael H, Harkonen PL, Vaananen HK, Hentunen TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res* 2005; 20(12): 2224–2232.
- Michna H. Tendon injuries induced by exercise and anabolic steroids in experimental mice. *Int Orthop* 1987; 11(2): 157–162.
- Miles JW, Grana WA, Egle D, Min KW, Chitwood J. The effect of anabolic steroids on the biomechanical and histological properties of rat tendon. *J Bone Joint Surg Am* 1992; 74(3): 411–422.
- Miller PD, Siris ES, Barrett-Connor E, Faulkner KG, Wehren LE, Abbott TA, Chen Y, Berger ML, Santora AC, Sherwood LM. Prediction of fracture risk in postmenopausal white women with peripheral bone densitometry: evidence from the National Osteoporosis Risk Assessment. *J Bone Miner Res* 2002; 17(12): 2222–2230.
- Mitton D, Cendre E, Roux JP, Arlot ME, Peix G, Rumelhart C, Babot D, Meunier PJ. Mechanical properties of ewe vertebral cancellous bone compared with histomorphometry and high-resolution computed tomography parameters. *Bone* 1998; 22(6): 651–658.
- Monteagudo MD, Hernandez ER, Seco C, Gonzalez-Riola J, Revilla M, Villa LF, Rico H. Comparison of the bone robusticity index and bone weight/bone length index with the results of bone densitometry and bone histomorphometry in experimental studies. *Acta Anat (Basel)* 1997; 160(3): 195–199.
- Morley JE. Sarcopenia in the elderly. *Fam Pract* 2012; 29 Suppl 1: i44-i48.
- Mosekilde L, Danielsen CC, Sogaard CH, Thorling E. The effect of long-term exercise on vertebral and femoral bone mass, dimensions, and strength--assessed in a rat model. *Bone* 1994; 15(3): 293–301.
- Müller R, van Campenhout H, van Damme B, Van Der Perre, G, Dequeker J, Hildebrand T, Rüeggsegger P. Morphometric analysis of human bone biopsies: a

- quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998; 23(1): 59–66.
- Nordstrom A, Olsson T, Nordstrom P. Sustained benefits from previous physical activity on bone mineral density in males. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(7): 2600–2604.
- Notini AJ, McManus JF, Moore A, Bouxsein M, Jimenez M, Chiu, W S Maria, Glatt V, Kream BE, Handelsman DJ, Morris HA, Zajac JD, Davey RA. Osteoblast deletion of exon 3 of the androgen receptor gene results in trabecular bone loss in adult male mice. *J Bone Miner Res* 2007; 22(3): 347–356.
- Notomi T, Okazaki Y, Okimoto N, Saitoh S, Nakamura T, Suzuki M. A comparison of resistance and aerobic training for mass, strength and turnover of bone in growing rats. *Eur J Appl Physiol* 2000; 83(6): 469–474.
- Notomi T, Okimoto N, Okazaki Y, Tanaka Y, Nakamura T, Suzuki M. Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in growing rats. *J Bone Miner Res* 2001; 16(1): 166–174.
- Odgaard A, Gundersen HJ. Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. *Bone* 1993; 14(2): 173–182.
- Odgaard A, Linde F. The underestimation of Young's modulus in compressive testing of cancellous bone specimens. *J Biomech* 1991; 24(8): 691–698.
- Ohno H, Goto S, Owaki M, Ohta J, Nakajima N, Nakata K, Mutoh K, Oyamada T, Yoshioka K. Immunohistochemical study on androgen receptors in the anterior cruciate ligament in dogs. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2013; 90(2): 31–39.
- Pack AM, Morrell MJ, Randall A, McMahon DJ, Shane E. Bone health in young women with epilepsy after one year of antiepileptic drug monotherapy. *Neurology* 2008; 70(18): 1586–1593.
- Parfitt AM. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int* 1984; 36 Suppl 1: S123–8.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987; 2(6): 595–610.
- Poor G, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton, L J 3rd. Determinants of reduced survival following hip fractures in men. *Clin Orthop Relat Res* 1995(319): 260–265.
- Raab DM, Smith EL, Crenshaw TD, Thomas DP. Bone mechanical properties after exercise training in young and old rats. *J Appl Physiol* (1985) 1990; 68(1): 130–134.
- Ralston SH. Genetic determinants of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17(4): 475–479.
- Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul, M C, Adami S, Compston J, Phenekos C, Devogelaer JP, Curiel MD, Sawicki A, Goemaere S, Sorensen OH, Felsenberg D, Meunier PJ. Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5): 2816–2822.
- Reim NS, Breig B, Stahr K, Eberle J, Hoeflich A, Wolf E, Erben RG. Cortical bone loss in androgen-deficient aged male rats is mainly caused by increased endocortical bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2008; 23(5): 694–704.
- Ren SG, Malozowski S, Sanchez P, Sweet DE, Loriaux DL, Cassorla F. Direct administration of testosterone increases rat tibial epiphyseal growth plate width. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 121(3): 401–405.
- Rittweger J, Frost HM, Schiessl H, Ohshima H, Alkner B, Tesch P, Felsenberg D. Muscle atrophy and bone loss after 90 days' bed rest and the effects of flywheel

- resistive exercise and pamidronate: results from the LTBR study. *Bone* 2005; 36(6): 1019–1029.
- Rodgers JB, Monier-Faugere MC, Malluche H. Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone* 1993; 14(3): 369–377.
- Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24): 13960–13965.
- Roghani T, Torkaman G, Movasseghe S, Hedayati M, Goosheh B, Bayat N. Effects of short-term aerobic exercise with and without external loading on bone metabolism and balance in postmenopausal women with osteoporosis. *Rheumatol Int* 2013; 33(2): 291–298.
- Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999; 27(8): 1229–1241.
- Rubin CT, Lanyon LE. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int* 1985; 37(4): 411–417.
- Rubin J, Biskobing D, Fan X, Rubin C, McLeod K, Taylor WR. Pressure regulates osteoclast formation and MCSF expression in marrow culture. *J Cell Physiol* 1997; 170(1): 81–87.
- Rubin J, Murphy T, Nanes MS, Fan X. Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278(6): C1126–32.
- Rüegsegger P, Koller B, Müller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 1996; 58(1): 24–29.
- Sanyal A, Hoey KA, Modder UI, Lamsam JL, McCready LK, Peterson JM, Achenbach SJ, Oursler MJ, Khosla S. Regulation of bone turnover by sex steroids in men. *J Bone Miner Res* 2008; 23(5): 705–714.
- Schroeder ET, Hawkins SA, Jaque SV. Musculoskeletal adaptations to 16 weeks of eccentric progressive resistance training in young women. *J Strength Cond Res* 2004; 18(2): 227–235.
- Schwane JA, Armstrong RB. Effect of training on skeletal muscle injury from downhill running in rats. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1983; 55(3): 969–975.
- Silvent J, Nassif N, Helary C, Azaïs T, Sire J, Guille, Marie Madeleine Giraud, Zeugolis D. Collagen Osteoid-Like Model Allows Kinetic Gene Expression Studies of Non-Collagenous Proteins in Relation with Mineral Development to Understand Bone Biomineralization. *PLoS ONE* 2013; 8(2): e57344.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89(2): 309–319.
- Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(5): 444–451.
- Sinaki M, Pfeifer M, Preisinger E, Itoi E, Rizzoli R, Boonen S, Geusens P, Minne HW. The role of exercise in the treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2010; 8(3): 138–144.
- Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh AB, Lee MI, Storer TW, Casaburi R, Shen R, Bhasin S. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283(1): E154–64.

- Sinha-Hikim I, Roth SM, Lee MI, Bhasin S. Testosterone-induced muscle hypertrophy is associated with an increase in satellite cell number in healthy, young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285(1): E197-205.
- Sinnesael M, Claessens F, Boonen S, Vanderschueren D. Novel insights in the regulation and mechanism of androgen action on bone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2013; 20(3): 240–244.
- Smith MR. Osteoporosis during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Urology* 2002; 60(3 Suppl 1): 79-85; discussion 86.
- Smith MR, Finkelstein JS, McGovern FJ, Zietman AL, Fallon MA, Schoenfeld DA, Kantoff PW. Changes in body composition during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(2): 599–603.
- Stratos I, Rotter R, Eipel C, Mittlmeier T, Vollmar B. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. *J Appl Physiol* (1985) 2007; 103(5): 1857-1863.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20(3): 345–357.
- Tamaki H, Akamine T, Goshi N, Kurata H, Sakou T. Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. *Bone* 1998; 23(2): 147–153.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289(5484): 1504–1508.
- Tipton CM, Tcheng TK, Mergner W. Ligamentous strength measurements from hypophysectomized rats. *Am J Physiol* 1971; 221(4): 1144–1150.
- Tipton KD, Wolfe RR. Exercise, protein metabolism, and muscle growth. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2001; 11(1): 109–132.
- Trebsdorf M. *Biologie, Anatomie, Physiologie*, 7th ed. Reinbek: Lau; 2002.
- Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001; 1: 66–81.
- Turner CH. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone* 1998; 23(5): 399–407.
- Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14(4): 595–608.
- Turner CH, Robling AG. Mechanisms by which exercise improves bone strength. *J Bone Miner Metab* 2005; 23 Suppl: 16–22.
- Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2001; 2(1): 117–127.
- Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 1994; 15(3): 275–300.
- Umemura Y, Ishiko T, Yamauchi T, Kurono M, Mashiko S. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J Bone Miner Res* 1997; 12(9): 1480–1485.
- Vanderschueren D, Gaytant J, Boonen S, Venken K. Androgens and bone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008; 15(3): 250–254.
- Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004; 25(3): 389–425.
- Vermeulen A. Andropause. *Maturitas* 2000; 34(1): 5–15.
- Wallace JM, Rajachar RM, Allen MR, Bloomfield SA, Robey PG, Young MF, Kohn DH. Exercise-induced changes in the cortical bone of growing mice are bone- and gender-specific. *Bone* 2007; 40(4): 1120–1127.
- Walmsley B, Hodgson JA, Burke RE. Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *J Neurophysiol* 1978; 41(5): 1203–1216.

- Wang QJ, Suominen H, Nicholson, P H F, Zou LC, Alen M, Koistinen A, Cheng S. Influence of physical activity and maturation status on bone mass and geometry in early pubertal girls. *Scand J Med Sci Sports* 2005; 15(2): 100–106.
- Warner SE, Shea JE, Miller SC, Shaw JM. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcif Tissue Int* 2006; 79(6): 395–403.
- Welch JM, Weaver CM, Turner CH. Adaptations to free-fall impact are different in the shafts and bone ends of rat forelimbs. *J Appl Physiol* (1985) 2004; 97(5): 1859–1865.
- Wink CS, Felts WJ. Effects of castration on the bone structure of male rats: a model of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1980; 32(1): 77–82.
- Wood TO, Cooke PH, Goodship AE. The effect of exercise and anabolic steroids on the mechanical properties and crimp morphology of the rat tendon. *Am J Sports Med* 1988; 16(2): 153–158.
- Wu J, Wang XX, Takasaki M, Ohta A, Higuchi M, Ishimi Y. Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 2001; 16(10): 1829–1836.
- Wu Z, Lei W, Hu Y, Wang H, Wan S, Ma Z, Sang H, Fu S, Han Y. Effect of ovariectomy on BMD, micro-architecture and biomechanics of cortical and cancellous bones in a sheep model. *Med Eng Phys* 2008; 30(9): 1112–1118.
- Wu, Frederick C W, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, Bartfai G, Casanueva FF, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean, Michael E J, Pendleton N, Punab M, Boonen S, Vanderschueren D, Labrie F, Huhtaniemi IT. Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363(2): 123–135.
- Yeh JK, Liu CC, Aloia JF. Additive effect of treadmill exercise and 17 beta-estradiol replacement on prevention of tibial bone loss in adult ovariectomized rat. *J Bone Miner Res* 1993; 8(6): 677–683.
- Young DR, Niklowitz WJ, Brown RJ, Jee WS. Immobilization-associated osteoporosis in primates. *Bone* 1986; 7(2): 109–117.
- Zhang Y, Shi S, Ciurli C, Poole AR. Animal models of ankylosing spondylitis. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4(6): 507–512.

## 8 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn PD Dr. med. habil. Ioannis Stratos für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, sowohl in der Entwicklung des Themas als auch in der Fertigstellung der Promotion. Anregende Diskussionen, sowie seine hilfreiche Unterstützung, aber auch konstruktive Kritik haben mich immer wieder aufs Neue ermutigt und motiviert die Arbeit voranzutreiben.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die wissenschaftliche Unterstützung und so manchen guten Ratschlag und natürlich für die Möglichkeit, diese Dissertation an Ihrem Institut durchführen zu können.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie. Ein großes Dankeschön an Kathrin Sievert, Andrea Wilhelm und Reinhard Schwärmer für die verantwortungsvolle prä- und postoperative Betreuung sowie Pflege der Versuchstiere. Ebenso gilt mein Dank Frau Berit Blendow für die Durchführung der Laboranalyse. Weiterhin möchte ich Dr. rer. nat. Ann-Kathrin Behrendt und Dr. med. Philipp Herlyn für die unkomplizierte Hilfe bei technischen Angelegenheiten danken.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau PD Dr. med. Tina Histing vom Universitätsklinikum des Saarlandes, die mir freundlich und hilfsbereit bei der 3-Punkt-Biegemessung zur Seite stand und bei den Mitarbeitern des Instituts für Sportwissenschaften unter Leitung von Prof. Dr. Sven Bruhn, die bei der Ausarbeitung des Trainingsprotokolls einen wesentlichen Beitrag geleistet haben.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir immer mental und finanziell beigestanden haben und mir meine Ausbildung somit ermöglichten.

*Konrad Schröpfer*

## **9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht wurde.

Rostock, 09.12.2014